

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1925-1926

N° 19

Recherches sur deux méthodes
de
Dosage de l'Acide phosphorique

Application à l'étude des glycérophosphates
et du phosphore organique urinaire

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 Juillet 1926

PAR

Zaharie SUTU, Pharmacien

BISTRITZA (Roumanie)

JURY { MM. GRIMBERT, *Président.*
DELEPINE, *Professeur.*
HERISSEY, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DES PRESSES MODERNES

45, RUE DE MAUBEUGE, 45

1926



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553022_0069

Recherches sur deux méthodes
de
Dosage de l'Acide phosphorique

Application à l'étude des glycérophosphates
et du phosphore organique urinaire

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 19 Juillet 1926

PAR

Zaharie SUTU, Pharmacien

BISTRITZA (Roumanie)

JURY { M.M. GRIMBERT, *Président.*
DELEPINE, *Professeur.*
HERISSEY, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DES PRESSES MODERNES

45, RUE DE MAUBEUGE, 45

1926

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, Doyen, O. *, $\frac{1}{2}$ I.
 PERROT, Assesseur, O. *, $\frac{1}{2}$ I.
 G. DURSENT, Secrétaire, *, $\frac{1}{2}$ I.

PROFESSEURS

MM.

GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. *, $\frac{1}{2}$ I.	Botanique générale.
H. GAUTIER, O. *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie minérale.
RADAIS, O. *, $\frac{1}{2}$ I.	Cryptogamie et Microbiologie
BEHAL, Membre de l'Institut, C. *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, $\frac{1}{2}$ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, *, $\frac{1}{2}$ I.	Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut, $\frac{1}{2}$ I.	Physique.
GRIMBERT, *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *, $\frac{1}{2}$ I.	Pharmacie chimique.
DELEPINE, O. *, $\frac{1}{2}$ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, *, $\frac{1}{2}$ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie analytique.
GORIS, *, $\frac{1}{2}$ I.	Pharmacie galénique.

Doyens Honoraires :

MM. GUIGNARD, C. *, $\frac{1}{2}$ I. et H. GAUTIER, O. *, $\frac{1}{2}$ I.

Professeurs Honoraires :

MM. MOUREU, G.O. *, $\frac{1}{2}$ I. et A. VILLIERS, *, $\frac{1}{2}$ I.



CHARGES DE COURS

MM.

TASSILLY, *, $\frac{1}{2}$ I.	Minéralogie.
Marc HONNORAT, *, $\frac{1}{2}$ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, *, $\frac{1}{2}$ I.	Cryptogamie.
GUÉRIN, *, $\frac{1}{2}$ I.	Botanique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

SOMMELET, *, $\frac{1}{2}$ I.
 DAMIENS, $\frac{1}{2}$ I.

MM.

TASSILLY, *, $\frac{1}{2}$ I.
 GUÉRIN, *, $\frac{1}{2}$ I.
 LUTZ, *, $\frac{1}{2}$ I.

MM.

LAUNOY, *, $\frac{1}{2}$ I.
 HÉRISSEY, *, $\frac{1}{2}$ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM.

DEFACQZ, *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie générale.
COUSIN, *, $\frac{1}{2}$ I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, $\frac{1}{2}$ I.	Micrographie.
LEROUX, $\frac{1}{2}$ I.	Physique.
DEVAL, $\frac{1}{2}$ I.	Microbiologie.
FRANÇOIS, *, $\frac{1}{2}$ I.	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, $\frac{1}{2}$ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. GRIMBERT

Membre de l'Académie de Médecine

Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de respectueux dévouement.

A MONSIEUR P. FLEURY

Docteur ès sciences

Hommage de profonde reconnaissance.

INTRODUCTION

Le phosphore est un élément dont on connaît l'importance biologique considérable et qui joue d'autre part un grand rôle en thérapeutique ; aussi la détermination de ce corps a donné lieu à de multiples travaux et de très nombreuses méthodes de dosage ont été élaborées.

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'étudier deux de ces méthodes ainsi que quelques-unes de leurs applications.

La première est l'élégante méthode de Copaux qui nous a séduit par sa simplicité et que nous avons tenté d'appliquer à l'étude des glycérophosphates, surtout au point de vue de leurs essais.

La seconde est la méthode colorimétrique remarquable par sa sensibilité. Nous l'avons utilisée pour l'étude d'un problème assez délicat de chimie urinaire, celui du phosphore organique de l'urine.

Notre travail comprend donc deux parties :

Première partie : la méthode de Copaux. Son application à l'étude des glycérophosphates.

Deuxième partie : la méthode colorimétrique. Son application à l'étude du phosphore organique urinaire.

Ces deux parties ne sont pas, d'ailleurs, aussi indépendantes qu'elles semblent l'être à première vue. Pour les deux cas s'est posé pour nous un même problème, la minéralisation du phosphore organique que nous avons résolu dans les deux cas de la même façon.

Avant de commencer cet exposé, nous voulons assurer M. le Professeur Grimbert de notre respectueuse reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Nous tenons, enfin, à exprimer à M. P. Fleury, toute notre gratitude pour les conseils si éclairés qu'il nous a toujours pro-

digués, et pour l'aide extrêmement précieuse qu'il nous a prêtée pour mener à bien ce travail.

Nous adressons aussi nos remerciements à MM. les Professeurs Delépine et Hérissé, qui ont bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Dans mon pays, qui aime et admire la France avec la force de toute son âme nationale, j'emporte le souvenir d'hommes qui, passionnément attachés à la science et infatigablement dévoués à leur devoir, savent représenter avec tant d'ardeur et de dignité personnelle l'enseignement d'une profession, et qui — pour leur honneur — contribuent à un si haut degré à faire connaître leur pays.

Grâce à eux, j'ai appris à connaître et à aimer la France.

Au cours de ma carrière, je serai l'interprète fidèle de ces sentiments, qui constituent pour moi la plus grande richesse morale que j'ai pu acquérir dans ma jeunesse.

PREMIÈRE PARTIE

LA MÉTHODE DE COPAUX SON APPLICATION A L'ÉTUDE DES GLYCÉROPHOSPHATES

CHAPITRE I

ETUDE ET EXPOSE DE LA METHODE COPAUX

§ I. — EXPOSÉ.

La méthode de COPAUX repose sur le fait suivant :

Quand une certaine quantité d'acide phosphorique, additionné d'un autre acide (sulfurique, chlorhydrique, azotique) est agitée avec de l'éther et un molybdate alcalin, il se forme de l'acide phospho-molybdique, qui, uni à l'éther et à l'eau, produit un liquide jaune, non miscible à son eau mère.

Ce fut MARIGNAC (1) qui constata, le premier, cette réaction sur l'acide silico-tungstique. En 1877, DRECHSEL en tira un procédé de préparation des acides complexes du molybdène et du tungstène. Cette préparation est générale pour les séries en 24 Mo O_3 et 24 Tu O_3 , mais elle est particulièrement nette avec l'acide phospho-molybdique.

Le fait que 1 mg. de $\text{P}_2 \text{O}_5$ traité dans ces conditions est nettement précipité en une gouttelette d'un volume d'environ $1/20$ de centimètre cube, a déterminé, M. COPAUX à l'utiliser pour doser le phosphore. Ce procédé et ses applications à l'étude des glycéro-phosphates constituent la première partie de notre travail.

L'appareil nécessaire aux opérations de cette méthode con-

siste en une ampoule, formée d'une boule de verre d'une capacité de 60 cm³, portant un col long de 2 cm³ environ, à bord dressé et terminé à sa base par une douille de 80 mm. de long sur 6 mm. de diamètre intérieur, graduée en dixièmes de cm³, d'une capacité de 1,5 à 2 cm³. Un centrifugeur électrique ou à main, dont les bras encerclent l'ampoule est également indispensable.

Les réactifs nécessaires sont :

- 1° Une solution d'acide sulfurique à 200 gr. par litre.
- 2° Une solution de molybdate de soude préparée en dissolvant à chaud 100 gr. d'anhydride molybdique, dans 32 gr. de carbonate de soude dissous dans l'eau et complétée à un litre.
- 3° De l'éther officinal pur.
- 4° Une solution type de phosphate monopotassique pur à 3 gr. 778 0/00.

REMARQUE I. — DARIC (2) recommande quelques précautions pour préparer une solution stable de réactif molybdique et opère ainsi :

Le molybdate d'ammoniaque commercial, grossièrement pulvérisé, est chauffé très lentement dans un four à moufle, pour évaporer l'eau de cristallisation et la majeure partie de l'ammoniaque, puis, après refroidissement, la masse pulvérisée est soumise à une nouvelle calcination, jusqu'à élimination complète de l'ammoniaque.

L'acide molybdique, préparé dans ces conditions, est souvent verdâtre, à cause de la formation partielle d'un oxyde salin moins oxygéné que Mo O₃. On le verse peu à peu, à raison de 100 gr. de Mo O₃, dans une solution bouillante contenant environ 32 gr. de carbonate de soude pur et sec pour un litre. Ce liquide, légèrement vert, est maintenu à l'ébullition pendant quelques minutes et réoxydé par de l'eau bromée, jusqu'à décoloration.

Nous avons pensé à remplacer, dans cette préparation, le molybdate d'ammoniaque par de l'acide molybdique pur commercial, nous l'avons séché au four et utilisé à la préparation du réactif comme plus haut.

Il arrive parfois que ces réactifs préparés, soit d'après DARIC, soit avec de l'acide molybdique commercial, au bout de quelque temps, abandonnent un dépôt blanc plus ou moins abondant.

Le réactif qui nous a le mieux convenu, a été préparé avec de l'acide molybdique, tel qu'on le trouve dans le commerce, et employé sans l'avoir séché au préalable, et avec du carbonate de soude pur, desséché.

REMARQUE II. — Pour préparer la solution type de phosphore, PREGL (27) a recouru au phosphate double de sodium et d'ammonium renfermant $4 \text{ H}_2\text{O}$, qu'on peut également obtenir tout à fait pur.

COPAUX emploie une solution de phosphate mono-ammonique et recommande de la vérifier par la voie pondérale car la teneur en $\text{P}^2 \text{O}_5$ du produit commercial est souvent un peu inférieure à la quantité théorique de 61,75 0/0.

Mais, pour notre part, nous avons préféré le phosphate monopotassique, sel anhydre qu'il est facile d'obtenir pur. A remarquer que la solution, au bout d'un certain temps, présente un léger trouble. Pour l'éviter et assurer sa conservation, nous avons ajouté à la solution quelques cm^3 d'acide chlorhydrique déci-normal.

§ II. — VÉRIFICATION DE LA MÉTHODE AVEC UNE SOLUTION DE PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE PUR.

Avant d'essayer son application, nous avons tenu à vérifier son exactitude.

En suivant exactement les indications de l'auteur, nous servant toujours de la même ampoule, nous avons, sur des quantités différentes de 1, 2, 4, 8, 10 mgs de $\text{P}^2 \text{O}_5$, opéré de la façon suivante :

La solution à doser a été mise dans l'ampoule, portée à un volume d'environ 10 à 15 cm^3 , additionnés ensuite de 2 ou 3 cm^3 d'acide azotique et quelques cm^3 d'éther, de façon qu'il en surnage une couche de 3 à 4 mm.

L'ampoule, fermée par un bouchon en liège, est agitée fortement, puis la solution traitée par le réactif molybdique qui, séparé d'abord par la filtration au travers d'un peu de coton hydrophile, de son dépôt, s'il en contient, est ajouté, en fractions successives de 3 cm^3 , puis centrifugé pendant une minute, après chaque nouvelle addition, jusqu'à ce que deux lectures successives sur l'ampoule indiquent le même volume.

L'équilibre au centrifugeur est établi par une ampoule pareille, dans laquelle on a effectué la même opération.

Voilà ce que nous avons obtenu :

Prise d'essai en mgs.	Quantité d'acide azotique employés en cm ³	Les divisions obtenues à la lecture de l'ampoule
1	2	0,8
2	»	1,65
4	»	3,70
8	»	7,50
10	»	9,7

Il en résulte que le volume occupé par un milligramme de P² O⁵ ne correspond pas tout à fait exactement à une division de l'ampoule, car un mg. occupe 0,8 et 2 mgs 1,65 divisions.

En nous servant de la même ampoule, et opérant toujours dans les mêmes conditions, le volume occupé par un nombre X de mgs de P² O⁵ sera toujours le même.

On n'a qu'à faire, après l'opération, la conversion des chiffres en milligrammes de P² O⁵ correspondants. Nous savons que, à 2 mgs, le volume correspondant est de 1,65, donc pour un

volume de 1, 25, on aura : $X = \frac{2 \times 1,25}{1,65}$, ce qui nous donnera la teneur en P² O⁵ de la prise d'essai.

§ III. — CONDITIONS D'APPLICATION DE LA MÉTHODE DE COPAUX.

Avant de commencer l'étude proposée de ses applications au dosage des glycérophosphates, à leurs préparations et au dosage du phosphore organique urinaire, nous avons cru utile d'examiner :

1° Quel rapport doit exister entre la quantité d'acide azotique et de réactif molybdique, pour assurer les meilleurs résultats.

2° L'application de la méthode au dosage des glycérophosphates minéralisés, par la méthode nitrico-magnésienne de FONTES et THIVOLLE, légèrement modifiée (voir les détails, deuxième partie, chapitre III) ; l'influence de certaines matières organiques sur la réaction.

L'acide que nous avons employé dans ce but, contrairement à

l'auteur, qui utilise l'acide sulfurique, a été l'acide azotique, parce que nous nous en servons en même temps dans la destruction.

La substance à détruire était le glycérophosphate de soude de Codex.



La solution type a été préparée avec 8 gr. 627 de glycérophosphate de soude (1) pour 1.000 cm³, de façon qu'elle ait un titre de 2 gr. de P² O⁵ exactement.

Des quantités différentes de cette solution comprises entre 1 et 30 mgs ont été soumises à la destruction nitrico-magnésienne avec :

2 cm³ d'acide azotique et 1 cm³ solution saturée de nitrate de magnésie jusqu'à 20 mgs P² O⁵.

4 cm³ d'acide azotique et 2 cm³ solution saturée de nitrate de magnésie jusqu'à 20 mgs P² O⁵.

5 cm³ d'acide azotique et 2,5 cm³ solution saturée de nitrate de magnésie jusqu'à 30 mgs P² O⁵.

D'autre part, la quantité d'acide azotique a été doublée et triplée afin de voir si la réaction dans des milieux rendus ainsi deux ou trois fois plus acides, se produirait dans les mêmes conditions.

Le résidu de la destruction nitrico-magnésienne repris successivement par 2, 4 et 6 cm³ d'acide et environ 6 cm³ d'eau est introduit après sa dissolution dans l'ampoule, additionné de 5 cm³ d'éther, puis traité par le réactif molybdique, en fractions de 3 cm³ chacune, en ayant soin de bien agiter et de centrifuger après chaque addition de réactif pendant une minute.

On trouvera, dans le tableau ci-dessous, les résultats obtenus (exprimés en mgr. de P² O⁵), pour chaque dose de P² O⁵ mis en œuvre, en fonction à la fois du volume de réactif molybdique et du volume d'acide nitrique introduits.

(1) Nous tenons ici à remercier M. O. Bailly de l'amabilité avec laquelle il a mis généreusement à notre disposition les glycérophosphates purs dont nous nous sommes servis dans nos expériences.

P ₂ O ₅ , sous forme de glycérophosphate de soude	Quantité de réactif molybdique employé en cm ³	Acide azotique employé		
		2 cm ³ NO ₃ H	4 cm ³ NO ₃ H	6 cm ³ NO ₃ H
30 mgs P ₂ O ₅	3	8	10,3	11
	6	17	10	24
	9	24	28	30,1
	12	23	28,6	30
	15	12	29,6	30
	18	complètem. disparu	29,5	30
20 mgs	3	8,7	9	0,5
	6	15	14,3	8,2
	9	19,1	19,4	19,1
	12	19	19	19,8
	15	18,5	»	19,8
	18	17,2	»	»
10 mgs P ₂ O ₅	21	15	»	»
	3	2	1,2	traces
	6	2	1,8	traces
	9	2	2	1,6
	12	2	2	1,8
	15	2	2	1,9
2 mgs P ₂ O ₅	3	7,3	9	1
	6	9,75	10	7
	9	9,75	10	10,1
	12	9,5	etc.	10,1
	15	9	»	10,1
	18	8	»	»
1 mg. P ₂ O ₅	21	etc.	»	»
	3	1	une gouttelette à peine visible	rien
	6	1	»	rien
	9	1	»	rien
	12	»	0,4	traces
	15	»	0,8	0,40
	18	»	0,9	0,70
	21	»	»	0,80
	24	»	»	0,90

1 division

CONCLUSION

Ce tableau nous indique qu'une concentration correspondant à 2 cm³ d'acide, est insuffisante pour assurer la précipitation totale de 30 mgs de P² O⁵, quelle que soit la quantité de molybdate, car le maximum de la séparation est, dans ces conditions, de 24 au lieu de 30 mgs, ce dernier chiffre est atteint avec 6 cm³ d'acide et 9 cm³ de réactif.

Pour la prise d'essai de 20 mgs P² O⁵, cette condition se réalise avec 4 cm³ d'acide et 9 cm³ de réactif, pour 10 mgs avec 2 à 4 cm³ d'acide et, pour 1 mg. avec 2 cm³ d'acide pour 3 de réactif.

Nous voyons également que, dans les conditions les plus favorables d'acidité, 3 cm³ de réactif molybdique permettent la séparation en moyenne de 10 mgs de P² O⁵ au maximum, chaque cm³ précipitant donc, au maximum, 3 mgs 3 de P² O⁵.

Sur quelques expériences effectuées parallèlement avec une solution de phosphate de potasse, nous avons trouvé qu'en opérant avec des quantités différentes de P² O⁵ minéral, le rapport entre l'acide et le réactif est le même.

Pour assurer la précipitation totale du phosphore, il faut d'abord réaliser deux conditions : 1° Une concentration en acide suffisante ; 2° Un certain rapport entre la quantité de réactif molybdique et d'acide.

La quantité d'acide dans laquelle on doit dissoudre le résidu, obtenu par la destruction, variera donc selon la quantité de P² O⁵ présumée dans la prise d'essai. Elle peut être fixée ainsi :

Pour une quantité de P² O⁵ comprise entre 1 et 10 mgs, une quantité d'acide de 2 cm³.

Pour une quantité de P² O⁵ comprise entre 10 et 20 mgs, une quantité d'acide de 4 cm³.

Pour une quantité de P² O⁵ comprise entre 20 et 30 mgs, une quantité d'acide de 6 cm³.

La quantité de réactif à employer devra aussi varier de façon à avoir le rapport optima, soit :

de 1 à 10 mgs	3 à 6 cm ³ de réactif
de 10 à 20 mgs	6 à 9 cm ³ —
de 20 à 30 mgs	9 à 12 cm ³ —

La destruction nitrico-magnésienne n'amène-t-elle pas de trouble dans le dosage ? — Une fois le rapport entre l'acide et le réactif établi, ainsi que les quantités d'acide azotique et de nitrate de magnésie nécessaires à la destruction du glycérophosphate, ces indications nous ont servi comme base dans les opérations que nous avons effectuées, afin de connaître l'exactitude de la méthode et l'influence que les produits de la destruction nitrico-magnésienne pourraient avoir sur son équilibre, et nous avons effectué quelques dosages dont voici les résultats :

1° Différentes quantités de $P_2 O_5$ minéral dosées telles quelles.

2° Les mêmes quantités après les avoir traités comme pour la destruction nitrico-magnésienne.

3° Les mêmes quantités de $P_2 O_5$ prises sous forme de glycérophosphate, puis soumises à la destruction.

Les résultats consignés dans le tableau ci-dessous donnent les résultats lus sur l'instrument.

Prise d'essai en mgs P ₂ O ₅	Conditions expérimentales		Le phosphore est introduit sous forme			
	acide azotique en cm ³	Réactif molybdique en cm ³	minérale		organique av. destruct.	
			avant la destruction	après la destruction		
1	2 cm ³	Les proportions correspon- dantes par fractions succes- sives.	0,8	0,8	0,35	
2			0,75	0,75	0,80	
			1,65	1,65	1,70	
4			3,65	3,65	3,60	
8			3,70	3,70		
			7,50	7,50	7,50	
10	4 cm ³			9,7	9,7	9,7
20				19,4	19,4	19,2
30				29	29	29
30	6 cm ³			29	29	29

La destruction nitrico-magnésienne n'est aucunement défavorable à la réaction de la méthode et nous retrouvons bien le phosphore introduit sous forme de glycérophosphate.

CHAPITRE II

APPLICATIONS

§ I. — APPLICATION DE LA MÉTHODE À L'ÉTUDE DES GLYCÉROPHOSPHATES.

La méthode actuellement en usage pour le dosage des glycérophosphates (de calcium et de soude) est la méthode pondérale qui dose le phosphore à l'état de pyrophosphate de magnésie, après la destruction préalable de ces substances avec 4 ou 5 fois leur poids d'azotate alcalin.

M. FRANÇOIS (3) se propose d'étudier les méthodes pratiques d'analyse des glycérophosphates commerciaux et celles des granulés de glycérophosphates de calcium.

Elles comprennent la détermination de l'eau, du résidu de la calcination, du phosphore et du métal.

D'après lui, il serait rigoureusement nécessaire de n'opérer que sur des produits séchés à 145 ou 150°, car la teneur en eau du glycérophosphate de calcium varie de 5 à 17 0/0.

Après avoir tenté plusieurs modes de destruction de la matière organique qui exigeraient des moyens très énergiques, il s'est servi successivement d'azotate de potasse, préconisé par le Codex, d'acide azotique fumant à la température d'un bain-marie, de bisulfate de potasse, dont l'emploi présenterait des difficultés insurmontables, il arrive à préférer, à la fin, soit le mélange chromique, soit le nitrate de potasse.

Le calcium, libéré après la destruction, est éliminé par le molybdate d'ammoniaque. Le précipité jaune de phosphomolybdate est précipité après sa dissolution, dans l'ammoniaque, avec de la mixture magnésienne, recueilli et pesé après la calcination; à l'état de pyrophosphate de magnésie.

Voilà, en résumé, l'opération :

Placer la prise dessai contenant environ 0 gr. 5 de substance dans un creuset de nickel, d'une capacité de 100 cm³ environ, ajouter 4 gr. d'azotate de potasse pulvérisée, mélanger grossièrement les deux sels, en inclinant le creuset chauffé au rouge. Laisser refroidir, ajouter 25 cm³ d'eau environ, porter sur le bain-marie, et attendre la dissolution de l'azotate mêlé au phosphate de chaux formé.

En s'aidant d'un entonnoir et d'une pissette, faire passer la liqueur trouble dans un matras de 400 à 500 cm³ et laver le creuset et l'entonnoir avec de l'eau chargée d'acide azotique.

Ajouter à la liqueur devenue acide, 300 cm³ de réactif molybdique qui contient 60 gr. de molybdate d'ammoniaque et 720 grammes d'acide azotique d'une densité de 1,2 par litre et faciliter la précipitation du phosphomolybdate d'ammoniaque en maintenant 2 à 3 heures à 45°. Abandonner 24 heures.

Décanter le liquide surnageant le phosphomolybdate sur un petit filtre sans plis, et s'assurer que le réactif molybdique était en excès, en vérifiant que le liquide filtré précipite en jaune par addition d'une goutte de solution de phosphate de soude à 10 0/0. Laver le dépôt de phosphomolybdate avec du réactif molybdique dilué.

La chaux étant ainsi éliminée, placer l'entonnoir sur une fiole conique de 250 cm³, dissoudre le précipité de phosphomolybdate resté dans le matras, au moyen d'ammoniaque étendue de deux volumes d'eau, faire passer sur le filtre et laver le matras et le filtre avec de l'ammoniaque au tiers. Dans la solution ammoniacale, ajouter de l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que le précipité jaune qui apparaît ne se redissolve plus que lentement, puis 30 cm³ de mixture magnésienne et un excès d'ammoniaque.

Après 24 heures, laver et recueillir suivant les règles, le phosphate ammoniaco-magnésien ; calciner et peser à l'état de pyrophosphate de magnésie.

Ce procédé est susceptible d'une très bonne précision, mais on doit reconnaître qu'il est assez long.

Nous avons tenté de le remplacer comme suit :

- 1° La destruction nitratée par le mélange nitrico-magnésien.
- 2° Le dosage gravimétrique du phosphore par la méthode

Copaux et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus par la voie gravimétrique.

Le produit qui nous a servi dans cette opération a été le glycérophosphate de chaux β anhydre pur $P\ M = 210$ fourni par M. O. Bailly.

La technique est la suivante :

La prise d'essai de 0 gr. 5 de glycérophosphate mise dans un ballon Kjeldahl d'une capacité de 150 cm³ environ, a été additionnée de 10 cm³ d'acide azotique et 5 cm³ de solution saturée de nitrate de magnésie.

La destruction a été effectuée sur un bain métallique à 300° environ, jusqu'à cessation de vapeurs nitreuses, ce qui indique la fin de la réaction.

Le résidu repris par 10 cm³ d'acide azotique a été mis dans une fiole jaugée et complétée à 100 cm³.

10 cm³ du liquide prélevés dans l'ampoule Copaux, acidifiés avec 4 cm³ d'acide, additionnés de quelques cm³ d'éther, ensuite bien agités et traités par le réactif molybdique en fractions successives de 3 cm³, nous avons obtenu, avec 9 cm³ de réactif, 16,5 divisions, cela correspond à 168 à 169 milligrammes de $P^2\ O_5$ pour la quantité de glycérophosphate dosée, au lieu de 169 mgs 05 ; chiffre théorique.

La même quantité de glycérophosphate de chaux (0 gr. 5) dosée par la méthode gravimétrique, nous a donné, en pyrophosphate 0 gr. 2625 au lieu de 0 gr. 2643, chiffre théorique correspondant à 167 mgs 89 de $P^2\ O_5$.

Nous avons tenu à confirmer son application par plusieurs dosages, effectués sur un certain nombre d'échantillons de glycérophosphate de chaux provenant de différentes maisons de produits chimiques.

Préalablement, nous avons éliminé l'eau qu'il contient par le séchage à l'étuve à 110°, jusqu'au poids constant.

Echantillon n°	Perte d'eau % à 110° à l'étuve	P ₂ O ₅ mgs. sur le produit sec		
		théorique contenu dans la prise d'essai	trouvé par Copaux après la destruction nitrico- magnésienne	Différence %
1 (*)	—	169,05	168 mgs	— 0,6 0/0
2	5,2	»	156 mgs	— 7,7 0/0
3	4,3	»	152 mgs	— 10 0/0
4	8,5	»	154 mgs	— 8,8 0/0
5	5,3	»	153,7	— 9,1 0/0
6	5,1	»	158 mgs	— 6,5 0/0
7	5	»	151 mgs	— 10,6 0/0

§ II. — DOSAGE DU PHOSPHORE DANS LE SACCHARURE GRANULÉ DE GLYCÉROPHOSPHATE DE CHAUX.

Examen de l'influence des diverses matières organiques (sucre, acide tartrique, oxalique, etc.).

Quelques expériences préliminaires sur le dosage du phosphore dans le saccharure granulé de glycérophosphate de chaux, nous ayant donné des résultats un peu aberrants, nous avons été amenés à examiner l'influence de certaines substances, sur la réaction.

Nous avons d'abord soumis à la destruction nitrico-magnésienne, un mélange de glycérophosphate de soude en quantité connue et de saccharose.

Expérience N° 1. — Saccharose.

a) 1/2 gramme de saccharose additionné de 4 cm³ de solution de glycérophosphate type contenant 8 mg. P₂ O₅ additionnés de 0 gr. 5 de saccharose, sont soumis à la destruction par 10 cm³ d'acide et 5 cm³ de solution saturée de nitrate de magnésie.

Le résidu de la calcination, repris par 2 cm³ d'acide, nous donne avec :

3 cm ³ de réactif	0
6 cm ³ —	0
9 cm ³ —	5,3 divisions
12 cm ³ —	7,5 divisions
soit 8 mgs P ₂ O ₅	

Si la réaction eut été normale, il nous aurait fallu de 6 à 9 cm³ de réactif molybdique.

(*) Glycéro-phosphate pur fourni par M. O. Bailly.

b) 1 gr. de saccharose traité dans les mêmes conditions, le résidu de la destruction repris par 2 cm³ d'acide azotique nous donne avec

3 cm ³ de réactif	0
6 cm ³ —	0
9 cm ³ —	0
12 cm ³ —	0
15 cm ³ —	0
18 cm ³ —	0

Le résidu de la destruction obtenu en opérant sur 1 gr. de saccharose, acidifié fortement avec de l'acide azotique et traité par du chlorure de calcium, donne un précipité abondant d'oxalate de chaux, qui, dosé par le permanganate de potasse, a été trouvé en quantité d'environ 20 milligrammes.

Nous avons alors opéré la précipitation en présence d'acide oxalique.

Expérience N° 2. — Acide oxalique.

(Opération sur 2 mg. de P² O⁵ minéral)

a) 0 gr. 50 d'acide oxalique dissous dans 10 à 15 cm³ d'eau additionné de 2 mgs P² O⁵ minéral, acidifié par 2 cm³ d'acide azotique est additionné à nouveau d'éther.

Nous obtenons avec :

	Division
3 cm ³ de réactif	0
6 cm ³ —	0,2
9 cm ³ —	1
12 cm ³ —	1,75 soit 2 mgs.

b) 1 gr. d'acide oxalique. La quantité de P² O⁵ est également de 2 mgs qui, traité dans les mêmes conditions nous donne avec :

3 cm ³ de réactif	0
6 cm ³ —	0
9 cm ³ —	0
12 cm ³ —	0
15 cm ³ —	1

Il y a un déplacement sensible entre le rapport normal de l'acide et du réactif. On aurait dû employer seulement 3 cm³ de réactif. Une quantité plus petite de 0 gr. 1, par exemple, n'apporte aucun déséquilibre dans la réaction, car la quantité de P² O⁵ mise en œuvre est précipitée dès l'addition des trois premiers cm³ de réactif.

Nous nous sommes demandés si la chaux n'amenaît pas quel-

que perturbation. L'expérience ci-dessous répond à cette question.

Expérience N° 3. — Calcium.

a) 0 gr. 5 d'une solution de chlorure de calcium à 30 0/0 additionnés de 8 mgs P₂ O₅ du glycérophosphate et détruits, le résidu soluble dans 2 cm³ donne avec :

3 cm ³ de réactif	3
6 cm ³ —	7,5

b) 1 gr. de la même substance, traité dans les mêmes conditions, donne avec :

3 cm ³ de réactif	0
6 cm ³ —	7,5

DOSAGE DU GRANULE COMMERCIAL

Pour vérifier l'exactitude de la méthode, nous avons dosé le phosphore contenu dans un granulé commercial sur des prises d'essai différentes. Nous avons employé pour la destruction 10 cm³ d'acide azotique et 5 cm³ de solution saturée d'azotate de magnésie.

Substance en grammes	Résultat par 100 gr. de granulé	
	en P ₂ O ₅	en glycéro- phosphate
0,5147	2,39	7,67
0,6422	2,31	7,40
0,7507	2,31	7,40
0,8631	2,41	7,73

On voit que les résultats sont pratiquement constants.

CONCLUSION

De ces expériences, nous concluons que la réaction de la méthode est plus ou moins influencée par la présence de certaines substances organiques, influence dont la conséquence est le déplacement du rapport acide-réactif.

La saccharose, en quantité de 0 gr. 5 apporte un déséquilibre sensible dans la proportion. La réaction nécessite 12 cm³ de réactif au lieu de 6 pour la même quantité d'acide employée et 1 gr. de saccharose employé dans les mêmes conditions empêche totalement la réaction.

Cette perturbation semble devoir être attribuée, tout au moins en partie, à la présence de l'acide oxalique qui, comme nous l'avons vu, se produit aux dépens du saccharose dans la destruction nitrico-magnésienne.

Le remède à cet inconvénient est d'augmenter la quantité des réactifs d'une façon convenable.

Un essai sur le granulé de glycérphosphate nous a donné des résultats constants.

§ III. — ETUDE COMPARATIVE DE L'HYDROLYSE DES GLYCÉROPHOSPHATES α ET β PAR LES ACIDES ALCALIS ET LES FERMENTS.

A. — *Hydrolyse comparée.*

La glycérine et l'acide phosphorique peuvent théoriquement donner un nombre considérable de combinaisons, mais si on envisage que les éthers formés, avec départ d'une seule molécule d'eau, deux combinaisons seulement sont possibles, l'une portant sur l'un des oxydriles primaires de la glycérine ce qui produit l'acide glycérphosphorique α



l'autre portant sur l'oxydrile secondaire, ce qui donne l'acide glycérphosphorique β :



Ces deux combinaisons étant de structures différentes, il semble qu'elles devraient se comporter d'une toute autre manière, sous l'action hydrolysante des acides, des alcalis et des ferments. Ce problème a déjà été envisagé par quelques auteurs.

En particulier, (40), O. BAILLY a déterminé la vitesse d'hydrolyse spontanée des deux glycérophosphates α et β , il a constaté qu'elle est égale.

Dans ce qui suit, nous examinerons successivement l'influence des acides, des alcalis et des ferments, sur les deux combinaisons d'acide glycérophosphorique α et β . Ils ont été préparés en traitant la solution de glycérophosphate de chaux α et β (BAILLY) par du carbonate de soude et ajustés au titre exact de 2 gr. par litre en $P^2 O_5$.

Technique

Elle se trouve légèrement modifiée par la présence de glycérophosphate de soude. Nous avons constaté qu'absolument comme pour l'acide oxalique, la méthode COPAUX est applicable avec succès. La seule chose de laquelle nous devons tenir compte est le déplacement du rapport acide réactif ; inconvénient d'ailleurs sans importance, car la façon d'opérer en présence d'une quantité suffisante d'acide, par additions successives de réactif nécessaire, jusqu'à ce que les deux lectures sur l'ampoule aient indiqué la même division, est susceptible de donner entière satisfaction.

Action des acides :

Expérience n° 1 : 100 cm³ de chacune de ces solutions ont été mis dans un ballon d'une capacité de 500 cm³ et additionnés de 10 cm³ d'acide chlorhydrique pur et concentré, et complétés à 200 cm³.

Le ballon, ensuite, muni d'un réfrigérant ascendant, est porté et maintenu à l'ébullition pendant 2, 4 et 8 heures.

Entre chaque intervalle, on prélève 20 cm³ du liquide hydrolysé, qu'on traite par la méthode COPAUX.

Nous avons obtenu dans les deux cas :

Après 2 heures : Avec 3, 6 et 9 cm³ de réactif molybdique, une faible teinte jaune indiquant des traces extrêmement faibles de phosphore provenant de la décomposition du glycérophosphate.

Après 4 heures : Avec

3 cm ³ de réactif	0,4 divisions
6 cm ³ —	0,4 —
9 cm ³ —	0,6 —

Après 8 heures : Avec

3 cm ³ de réactif	1,3 divisions
6 cm ³ —	1,8 —
9 cm ³ —	1,8 —

Le dédoublement varie donc de 0,2 à 0,9 0/0.

Expérience n° 2 : La quantité d'acide utilisée pour l'hydrolyse a été portée à un double volume et l'opération conduite de la même façon que la précédente, nous avons obtenu :

Après 2 heures. — Avec 9 cm³ de réactif pour le glycéro-phosphate α 0,8 et pour β , 0,9 divisions.

Après 4 heures. — Nous avons obtenu pour les deux cas, 2,5 divisions.

Après 8 heures. — Le dédoublement est plus accentué et nous avons : pour α , 3,9 et pour β , 4 divisions.

Action des alcalis

Les mêmes expériences que les précédentes, mais l'acide chlorhydrique a été remplacé par la lessive de soude. En ce cas, même après 8 heures d'hydrolyse et en portant la quantité employée à 20 0/0 nous avons des résultats tout à fait négatifs.

20 cm³ de la solution ainsi hydrolysée, neutralisée d'abord et acidifiée ensuite avec de l'acide chlorhydrique, ne donne qu'une teinte jaune sans formation d'aucun complexe phosphomolybdique.

Action des ferments

D'après les travaux de MAXWELL et STOKLASS (4), on sait que, dans les plantes, l'acide glycérophosphorique constitue la partie prédominante des phosphatides et spécialement de la lécithine.

SCHULTZE (4) a émis l'hypothèse que, dans les plantes ainsi que dans les organismes animaux, la décomposition de ces substances serait dûe aux ferments.

En effet, le dédoublement des phosphatides par les enzymes est depuis longtemps connu.

ZLATAROFFS (4) a constaté qu'une certaine plante *Cicer arietinum*, exposée à la lumière du jour, absorbant par les racines une émulsion de lécithine, préparée à l'eau, poussait deux à trois fois plus qu'une autre maintenue parallèlement dans l'eau dis-

tillée et que cette action dans le cas où on a maintenu le milieu stérile ne se produit pas.

De plus, certains organes animaux (spécialement les reins et le foie) contiendraient un ferment appelé glycérphosphatase, susceptible de dédoubler l'acide glycérphosphorique en ses constituants : glycérine et acide phosphorique.

NEMEC (4) a étudié un certain nombre de plantes, possédant les mêmes propriétés. Il a remarqué spécialement que les légumineuses et les crucifères contiendraient un ferment capable de provoquer la décomposition de l'acide glycérphosphorique jusqu'à 50 0/0 (les semences de ricin, de moutarde, de soya).

Il s'est servi, pour ses expériences, d'une solution à 50 0/0 de glycérphosphate de soude MERCK, qui ne présentait pas la réaction du phosphore. Il détermine d'abord le phosphore total, après la destruction sulfo-nitrique de la solution.

Dans un Erlenmeyer de 300 cm³ de capacité environ, il pèse 5 gr. de semences de ricins (par exemple) qui, broyées, sont maintenues stériles par 2 cm² de toluène et laissées dans une étuve à 25° pendant 24 heures.

La solution ainsi obtenue est traitée par quelques gouttes d'acide acétique et un peu de kaolin, et filtrée. Le phosphore contenu dans le filtrat est précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien* et dosé comme pyrophosphate.

Nous avons profité de ces indications et tenté de comparer les deux glycérphosphates α et β après les avoir soumis à l'action du ferment contenu dans les semences de moutarde blanche.

Il nous a fallu déterminer, au préalable, quelle est la quantité de phosphore que 5 gr. de semences maintenues à l'étuve à une température de 25° pendant 24 heures pouvaient libérer aux dépens des combinaisons organiques phosphorées qu'elles contiennent.

Nous avons fait l'expérience suivante :

1° 5 gr. de semences de moutarde blanche, pulvérisés ont été additionnés de 100 cm³ d'eau, 2 cm³ de toluène, et laissés à l'étude à 25° pendant 24 heures. Après avoir éliminé les substances protéiques par quelques cm³ d'acide acétique et un peu de kaolin, le liquide a été précipité à chaud par la mixture magnésienne. Le précipité obtenu a été dissous dans 10 cm³

d'acide azotique et complété à 100 cm³. Nous avons prélevé 20 cm³ du liquide et avons obtenu, par la méthode Copaux : 5 divisions, soit, au total, 25 mgs P² O⁵.

Deux autres expériences, effectuées parallèlement, sur 100 cm³ de solution de glycérophosphate α et β , au dosage par la méthode Copaux, nous donnent, sur 20 cm³ du liquide, 20,6 divisions, ce qui correspond, correction et calculs faits, à un dédoublement de 36 0/0.

Ces expériences nous montrent que les glycérophosphates α et β se comportent de la même façon sous l'action hydrolysante des acides. Cette action est très faible et, malgré une hydrolyse de 8 heures et l'emploi d'une quantité double d'acide chlorhydrique, (20 0/0), le phosphore libéré est de 2 0/0 seulement.

Au contraire, les ferments sont plus actifs, les semences de moutarde blanche arrivent, comme nous avons pu montrer dans nos expériences, jusqu'à un dédoublement de 36 0/0 de la quantité totale de P² O⁵ du glycérophosphate mis en œuvre.

*B. — Application à la recherche du phosphore minéral
dans les glycérophosphates commerciaux.*

Le glycérophosphate ne doit pas présenter la réaction du phosphore quand il est traité par le réactif molybdique, c'est-à-dire il ne doit pas contenir de phosphore minéral libre.

Les échantillons de glycérophosphates qui nous ont servi à l'étude de la méthode, ont été vérifiés au préalable, pour s'assurer de leur état de pureté par la méthode Copaux, et nous avons constaté qu'après l'addition des réactifs, il s'est produit un léger trouble, mais qu'ils sont tous restés incolores.

S'il contient des traces de phosphore, même très faibles, intervient immédiatement après l'addition des réactifs, une teinte jaune pâle. Nous avons cru intéressant de vérifier la sensibilité de cette réaction en opérant sur des quantités très petites de P² O⁵ minéral en présence de grandes quantités de glycérophosphate de soude.

Sensibilité : a) Dans ce but 1/2 gr. de glycérophosphate de soude a été additionné de 2 mgs P² O⁵ minéral et dosés d'après les indications déjà établies et nous avons avec :

3 cm ³ de réactif	0 divisions
6 cm ³ —	1
9 cm ³ —	1,75
Soit 2 mgs P ² O ⁵ .	

b) Un gramme de glycérophosphate de soude et même quantité de P² O⁵ minéral avec :

3 cm ³ de réactif	6
6 cm ³ —	0,1
9 cm ³ —	2

Donc, la présence, même exagérée de glycérophosphate provoquant seulement un léger déplacement d'équilibre dans le rapport acide réactif, est complètement inactive sur la réaction.

Stabilité du glycérophosphate. — Pour répondre à cette question, nous avons fait une expérience afin de voir si le glycérophosphate abandonné pendant un certain temps subit une auto-décomposition plus ou moins accentuée.

200 mgs de P² O⁵ sous forme de glycérophosphate de soude pur qui ne présente aucun changement avec le réactif molybdique, ont été mis dans l'ampoule, acidulés avec 2 cm³ d'acide azotique, additionnés d'éther et 9 cm³ de réactif, après avoir été bien agités, ils ont été fermés avec un bouchon en liège et abandonnés pendant un an et contrôlés à différents intervalles.

Après un mois, la liqueur commence à jaunir pour arriver, progressivement, au bout d'un an, à une séparation de 4 mgs de P² O⁵.

Une autre expérience effectuée avec un gramme de glycérophosphate de chaux et traité de la même façon, sépare également 3,9 mgs de P² O⁵.

CONCLUSION

Cette méthode se prête donc au dosage rapide de petites quantités de phosphore dans les glycérophosphates sans que, semble-t-il, il y ait à craindre de cause d'erreur par hydrolyse.

DEUXIÈME PARTIE

INTRODUCTION

En dehors des phosphates minéraux, l'urine renferme des composés phosphorés organiques.

Le phosphore de ces composés s'appelle dans la nomenclature française, « Phosphore incomplètement oxydé » tandis que les nomenclatures étrangères l'appellent « Phosphore organique ».

Les travaux consacrés jusqu'à présent à l'étude du phosphore incomplètement oxydé affectent des points de vue très divers, par exemple, cas normaux pathologiques ; jeunes enfants nourris au sein ou artificiellement ; adultes soumis à une alimentation riche en phosphore minéral ou phosphore organique ; son élimination soit pendant le jeûne, soit dans le cas de suralimentation avec de la caséine ou des dérivés de l'acide glycérophosphorique, soit pendant un travail physique ou cérébral, soit enfin pendant une inactivité absolue.

Et, cependant, tous ces points sont encore loin d'être élucidés.

On sait, et il est certain, qu'une partie extrêmement faible du phosphore urinaire échappe aux moyens habituels de précipitation du phosphore, passe dans le filtrat, et qu'il ne peut être décelé, qu'après la destruction préalable de la matière organique avec laquelle il se trouve combiné.

Comparativement aux plantes qui ont la propriété de transformer en phosphore organique le phosphore minéral, qu'elles puisent dans le sol, on pourrait supposer que de semblables élaborations se produisent dans l'organisme. Rien ne le confirme jusqu'à présent, au contraire, on admet que le phosphore organique constituerait une source de production de phosphore minéral.

D'après GUMLICH (6), chez un chien qui a ingéré une grande

quantité d'acide nucléique, extrait du thymus, on a enregistré une augmentation de 2 gr. 5, dans la quantité du phosphore minéral urinaire, tandis qu'une alimentation riche en phosphore minéral (phosphate de soude, par exemple) reste sans influence sur la quantité de phosphore organique éliminée.

A la suite de l'introduction dans l'organisme, d'un dérivé de l'acide glycérophosphorique, ou de caséine (substance riche en phosphore organique) la quantité de phosphore organique retrouvé dans l'urine est toujours très faible, insensiblement augmentée.

Loin de connaître exactement son origine, ainsi que l'importance qu'il a dans la physiologie, nous pouvons admettre qu'une partie du phosphore organique urinaire, proviendrait de l'alimentation par suite d'un manque de puissance d'oxydation de l'organisme humain, tandis que l'autre partie serait due à la désagrégation de divers tissus, et à la sécrétion de divers organes.

Ce qui est certain, c'est que sous l'influence de phénomènes encore inconnus, certaines combinaisons phosphorées apparaissent dans l'organisme et s'éliminent avant que leur oxydation soit complète.

Il serait également éliminé en forte proportion dans certains cas pathologiques : neurasthénie, tuberculose, leucémie, etc... Mais les affirmations se contredisent très souvent.

Les uns prétendent que les enfants malades élimineraient moins de phosphore organique que les enfants bien portants, et ceci contrairement aux adultes.

D'autres, que l'émission du phosphore organique pendant le jour serait supérieure à celle de la nuit, cependant que plusieurs affirment qu'elle serait inférieure.

Les auteurs présentent des chiffres exprimant la quantité de phosphore organique, trouvée dans les urines, tout à fait différents les uns des autres, variant dans les limites considérables de 6 à 600 milligrammes par 24 heures.

Nous devons, semble-t-il, chercher l'explication de tant d'affirmations contradictoires et d'un si grand écart entre les résultats obtenus, dans la diversité des procédés mis en œuvre pour son étude, et des méthodes analytiques employées qui diffèrent d'un auteur à l'autre.

En effet, on reproche à ces méthodes des défauts assez importants.

D'un côté, les moyens de précipitation du phosphore minéral employés ne sont pas tout à fait impeccables, pour assurer une séparation intégrale entre le phosphore minéral précipité et le phosphore organique imprécipitable.

D'un autre côté, les méthodes elles-mêmes présentent des incertitudes parfois exagérées, quant à la précision des résultats à obtenir.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de faire l'étude critique d'une méthode analytique pour le dosage du phosphore incomplètement oxydé, loin de toute considération physiologique, et ce sont les résultats obtenus dans cette voie que nous allons exposer dans la deuxième partie de ce travail.

CHAPITRE I

HISTORIQUE

RONALDS (7) fut le premier qui signala, dans l'urine, du phosphore non à l'état de phosphates, mais combiné avec des matières organiques. Ce fait est indiqué dans une courte note presque exclusivement consacrée au soufre, non à l'état d'acide sulfurique. Il reconnaît d'ailleurs que ses constatations auraient besoin d'être confirmées.

HOPPE SEYLER (8), en 1875, alors que la présence du phosphore organique avait été constatée dans des organes normaux et dans diverses sécrétions pathologiques, le remarqua dans les urines des leucémiques.

KLUPFEL et FEHLING (9) vinrent confirmer, également, l'existence de pareilles combinaisons organiques phosphorées dans les urines humaines.

SOTNITSCHESKY (10) constata que le phosphore organique urinaire se trouvait à l'état d'acide glycérophosphorique et constituait un élément normal urinaire.

Nous reproduisons ici son procédé.

10 litres d'urine, alcalinisée par un lait de chaux, sont additionnés de chlorure de calcium pour séparer l'acide phosphorique; le liquide filtré est concentré au bain-marie, le résidu traité par l'alcool. La partie insoluble dans l'alcool est dissoute dans un peu d'eau, et cette solution, afin d'enlever les dernières traces d'acide phosphorique, est traitée par la mixture magnésienne.

Après quelque temps, on filtre et le liquide est soumis à l'action de l'acide sulfurique par l'ébullition. Après refroidissement on ajoute de la mixture magnésienne, et après deux jours de repos, sur les parois et au fond du vase, se sont déposés des cristaux qui, à l'examen microscopique, présentent l'as-

pect de phosphate-ammoniac-magnésien, qui, traité par le réactif molybdique, donne la réaction du phosphore.

Dans le liquide filtré, on démontre également la présence de la glycérine de la manière suivante :

Le liquide est évaporé au bain-marie, le résidu traité par l'alcool, l'extrait alcoolique soumis à la distillation sèche avec du bisulfate de potassium, on constate alors l'existence de l'acroléine par son odeur caractéristique, et par sa réaction sur le nitrate d'argent. De plus, en chauffant l'extrait alcoolique sur une lame de platine avec du borax, on obtient une flamme verte.

LÉPINE et EYMONNET (11) ont été les premiers à introduire le problème du phosphore organique dans les cadres pratiques de la chimie médicale, et ont essayé d'opérer les premiers dosages qu'ils ont publiés dans le « Bulletin de la Société de Biologie », sous le titre :

« Détermination quantitative de l'acide glycéro-phosphorique, dans l'urine à l'état physiologique et dans diverses conditions anormales, notamment dans le cas de foie gras. »

Voici leur technique :

Les phosphates contenus dans 200 cm³ d'urine ont été précipités par la mixture magnésienne. Après 24 heures, le précipité de phosphate-ammoniac-magnésien a été séparé par filtration, le liquide filtré évaporé à sec, et le résidu calciné avec du nitrate de potassium. On obtient ainsi une masse saline, dans laquelle l'acide phosphorique est à l'état de phosphate, et qui, dissoute dans l'eau acidulée par l'acide azotique, est concentrée et traitée par le réactif molybdique. Après 12 heures de repos, le phosphomolybdate d'ammoniaque séché à l'étuve à 40°, est pesé.

A la suite de dosages effectués sur des urines malades et sur des urines normales (plus de 50 cas) ; ils concluent que, vu l'état variable de l'urine et d'autres conditions, les chiffres absolus par litre d'urine, d'acide glycérophosphorique, varient notablement. En général, chez les hommes à l'état normal, on en trouve environ un à un centigramme et demi par litre, mais si, ce qui vaut beaucoup mieux, d'après eux, on rapporte les chiffres obtenus et celui de l'azote total de l'urine, on observe que

si ce dernier est représenté par 100, celui de l'acide glycérophosphorique oscillera entre 0,15 et 0,30.

L'anomalie la plus grande qu'ils aient constatée, a été dans le cas de foie gras, chez les phtisiques, les chiffres obtenus variant entre 1 et 1,8, c'est-à-dire beaucoup plus élevés qu'à l'état normal.

ZUELZER (12) dose le phosphore organique par différence entre deux opérations ; une dans laquelle l'urine a été traitée telle quelle, et l'autre après le traitement à l'ébullition par de l'acide chlorhydrique. Le phosphore minéral est précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien et dosé ensuite soit par l'urane, soit alcalinimétriquement avec l'acide chlorhydrique N/10.

MARCUS (13) dose le phosphore organique dans les urines, après la destruction de la matière organique par la soude et le nitrate de potassium à l'urane ; les phosphates minéraux étant dosés par la même méthode. Dans les deux cas, les résultats obtenus sont peu différents. Il ne peut donc en tirer aucune conclusion pratique certaine.

PASCALIS (14) trouve également le phosphore organique en très faible quantité.

HORST OERTEL (15) emploie, pour le dosage du phosphore organique, la méthode suivante :

50 ou 100 cm³ d'urine sont soumis à la destruction par un mélange de nitrate de potassium et potasse caustique, le résidu est traité par le réactif molybdique et transformé en phosphomolybdate, le précipité est dissous ensuite dans l'ammoniaque et reprécipité par la mixture magnésienne. Après 24 heures de repos, on calcine et on pèse le pyrophosphate de magnésie obtenu. Le résultat correspond au phosphore total.

Pour déterminer le phosphore organique on effectue une deuxième précipitation en milieu ammoniacal avec une même quantité d'urine, par le chlorure de calcium, on filtre, on lave bien le précipité et, dans le filtrat ajouté aux eaux de lavage, on recherche le phosphore organique comme pour le phosphore total.

Sur 5 urines normales appartenant à des individus, dont l'alimentation a été maintenue constante, pendant 2 ou 3 jours,

il a trouvé pour 2 gr. de P² O⁵ minéral, environ 50 milligrammes de P² O⁵ organique.

La plus grande quantité éliminée en 24 heures a été de 120 et la plus basse de 30 milligrammes.

D. A. KELLER, (16) dose le phosphore organique gravimétriquement, par différence, de la façon suivante :

50 ou 200 cm³ d'urine selon leur teneur en phosphore minéral, sont soumis à la destruction par le mélange d'acides sulfurique et azotique dans un ballon de Kjeidahl. L'urine est d'abord additionnée de 10 cm³ d'acide azotique. On chauffe jusqu'à élimination des vapeurs nitreuses, on laisse refroidir et on ajoute 10 cm³ d'acide sulfurique, après un nouveau refroidissement, on ajoute en 2 ou 3 fractions environ 10 gr. de nitrate d'ammoniaque. La liqueur est ensuite neutralisée par l'ammoniaque, acidifiée ensuite fortement par l'acide azotique et précipitée par le réactif molybdique. Le précipité est dissous dans l'ammoniaque et reprécipité à l'état de phosphate ammoniacomagnésien d'après les indications données par Frésenius.

Le résultat correspond au phosphore total.

Le phosphore minéral est dosé de la même façon, sans destruction de l'urine par le mélange acide.

Ses observations concernent les nouveaux-nés, nourris au sein, et les enfants nourris avec du lait de vache additionné de phosphate de soude. Il trouve chez les enfants nourris artificiellement presque les mêmes chiffres que OERTEL chez les adultes, donc par rapport à leur poids plus élevés, de 0,5 à 0,9 p. 100 de la quantité totale de phosphore.

Enfin, un point tout particulier et intéressant à signaler, c'est l'expérience faite par l'auteur sur lui-même.

Il se propose de doser le phosphore organique et le phosphore minéral, pendant une période de jeûne de 4 jours, et il perd 3 kilogrammes 9 de son poids. Les chiffres qu'il obtient sur 24 heures sont les suivants :

	Phosphore minéral	Phosphore organique
Premier jour	1 gr. 854	0 gr. 017
Deuxième jour	1 gr. 901	0 gr. 029
Troisième jour	2 gr. 439	0 gr. 034
Quatrième jour	2 gr. 526	0 gr. 057

L'auteur aurait préféré employer, dit-il, pour le phosphate minéral, une méthode volumétrique, et pour le phosphore total, une méthode gravimétrique, mais trouvant le phosphore organique en si faible quantité, il est obligé de recourir, pour avoir des résultats comparables, dans les deux cas, à la méthode pondérale.

KLERK et KOOK (17) dosent le phosphore minéral à l'urane et le phosphore organique, après la destruction de l'urine par l'azotate alcalin, par l'alcalinimétrie du phosphate-ammoniacomagnésien et concluent que les chiffres obtenus après la destruction sont 3 à 4 pour 100 supérieurs aux précédents.

SATO dose le phosphore total dans les urines et les matières fécales, après la destruction par l'acide azotique et sulfurique, tandis que pour le phosphate seul, il effectue une extraction avec de l'acide chlorhydrique dilué. Il les dose colorimétriquement, par le ferrocyanure de potassium additionné à la solution acide de phosphate d'uranylé, comparé avec une solution type préparée de la même façon.

IOSHIMOTO (18) dose le phosphore minéral, après la précipitation à l'état de phosphate-ammoniacomagnésien, par la liqueur uranique. Il remplace la destruction acide par la destruction avec du carbonate et azotate de soude, pèse le phosphore organique à l'état de pyrophosphate de magnésie, et trouve que le rapport entre les phosphores minéral et organique est de 1,2 à 3 p. 100, avec une moyenne de 2,1 p. 100.

G. E. YOUNGBURG et G. W. PUCHER (19) sont les premiers qui emploient, pour le dosage du phosphore organique urinaire, une méthode tout à fait différente, la méthode colorimétrique de BELL et DOISY, que nous étudierons plus loin. Le phosphore minéral est isolé à l'état de phosphate ammoniacomagnésien, le filtrat est détruit par le mélange sulfonitrique et ensuite, le phosphore organique dosé au colorimètre.

Ils trouvent que, sur 12 personnes, la quantité de phosphore organique la plus basse est de 0 mg. 089 et la plus élevée de 0 mg. 187 par kg. du poids individuel, avec une moyenne de 0 mg. 138 en 24 heures.

Ils constatent, en même temps que l'émission en phosphore organique chez les hommes normaux varie considérablement

pendant la journée et pendant la nuit. Il y aurait une différence de 100 pour 100 de 2 en 2 heures, parfois même davantage.

CONCLUSION :

Nous voyons que presque tous les travaux qui sont consacrés à l'étude du phosphore organique sont inspirés du même principe :

1° Isoler d'abord, par un moyen de précipitation quelconque (mixture magnésienne, chlorure de calcium ou de baryum) les phosphates minéraux.

2° Ensuite, séparer le phosphore du complexe avec lequel il se trouve combiné, par une des méthodes connues pour la destruction de la matière organique (azotates alcalins et potasse, mélange acide, etc...).

3° Et, enfin, effectuer le dosage du phosphore organique minéralisé par des méthodes appropriées, donc 3 phases : élimination du phosphore minéral, minéralisation et dosage du phosphore organique.

Dans les trois chapitres suivants, nous allons étudier successivement ces trois phases dans l'ordre inverse : dosage, minéralisation et séparation.

CHAPITRE II

DOSAGE DU PHOSPHORE

Ce résumé bibliographique, assez largement exposé, nous montre que les méthodes qui ont servi jusqu'à présent au dosage du phosphore organique urinaire, sont, malgré le nombre considérable de travaux, assez restreintes, et que, seules, celles qui sont susceptibles d'être utilisées au dosage de très faibles quantités de phosphore ont pu trouver leur application.

En effet, elles se résument aux dosages gravimétriques, à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque, aux dosages alcalimétriques et colorimétriques.

Nous avons alors été amenés à faire une étude critique de quelques méthodes analytiques, les plus connues, susceptibles de s'appliquer au dosage de faibles quantités de phosphore organique urinaire.

Toutes les méthodes étudiées dans ce chapitre appartiennent à deux groupes : A. Phosphate-ammoniac-magnésien, et B. Combinaison phospho-molybdique.

Cette combinaison phospho-molybdique peut être étudiée de plusieurs manières, soit en la pesant (méthode gravimétrique), soit en dosant l'ammoniaque (méthode alcalimétrique ou formol titration), soit en utilisant l'acide phosphomolybdique, pour le réduire en bleu de molybdène (méthode colorimétrique).

§ I. — DOSAGE ALCALINIMÉTRIQUE DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE PAR L'ALCALINIMÉTRIE DU PHOSPHATE AMMONIACO-MAGNÉSIEN (MÉTHODE BAUZIL).

STOLBA (20) fut le premier qui utilisa, en 1876, l'équation suivante : $\text{PO}_4 \text{Mg N H}^4 + 2 \text{H Cl} = \text{PO}_4 \text{H}_2 \text{N H}^4 + \text{Cl}_2 \text{Mg}$, pour le dosage du phosphore, de la magnésie et de l'acide arsenique.

Ce procédé met en question la composition même du phosphate-ammoniac-magnésien, et comme précisément BAUZIL (21) a appliqué la méthode au dosage des phosphates minéraux urinaires, nous avons cru intéressant, chemin faisant, d'étudier les résultats de cet auteur, dont voici la technique :

50 cm³ d'urine, mis dans une capsule de porcelaine, sont détruits par un mélange de 5 cm³ d'acide chlorhydrique et 0 gr. 5 de chlorate de potassium. Le mélange est porté à l'ébullition jusqu'à décoloration complète de la masse, après quoi on porte le volume à 50 cm³ avec de l'eau distillée.

25 cm³ du liquide ainsi obtenus sont mis dans un verre à pied de 100 cm³ et précipités par 2 cm³ d'ammoniaque et 5 cm³ de mixture magnésienne. On agite et on laisse au repos une demi-heure.

Le précipité obtenu est filtré sur un filtre sans plis, lavé à l'eau ammoniacale, et à l'alcool jusqu'à réaction neutre, au tournesol, du liquide filtrant, et entraîné ensuite par un jet de pissette dans un récipient, de façon à avoir un volume de 60 cm³ environ.

Après avoir préparé l'étalon de coloration dans un autre récipient, contenant le même volume d'eau avec 2 gouttes d'hélianthine et 2 gouttes d'acide chlorhydrique N 10, on ajoute, dans le liquide à doser, 2 gouttes du même indicateur, et on titre avec une solution N 10 d'acide chlorhydrique, jusqu'à ce que le liquide devenant limpide prenne la teinte de l'étalon. On retranche, à la fin, du nombre de cm³ d'acide employé, les 2 gouttes correspondant à l'étalon, et on trouve la quantité de P² O⁵ contenue dans un litre d'urine, d'après la formule suivante : $(N-a) \times 0,00355 \times 40 = P$; N = le nombre de cm³ d'acide chlorhydrique employés et 0,00355 = l'équivalent en P² O⁵ d'un cm³ d'acide chlorhydrique N 10 ; a = nombre de divisions de cm³ nécessaires au virage.

Voici quelques-uns de nos résultats, obtenus en effectuant les dosages d'après la technique Bauzil, sur des urines soumises à l'action oxydante du mélange d'acide chlorhydrique et chlorate de potassium, et sur des urines n'ayant pas subi cette destruction, comparés aux résultats obtenus par la titration à l'urane.

Les résultats en gr. P² O⁵, par 1.000 cm³

DOSAGE A L'URANE	DOSAGE ALCALINIMETRIQUE		
	après la correction de 0 cm ³ due au virage	après destruction par l'acide chlorhydrique et chlorate de potassium	sans destruction
1	1,485	1,483	---
2	1,675	1,675	---
3	2,704	2,719	---
4	2,034	2,031	---
5	1,251	1,257	---
6	2,176	2,151	2,388
7	0,199	0,916	0,958
8	1,855	1,938	1,988
9	2,144	2,206	2,383
10	0,305	0,312	0,327
11	1,861	1,938	1,988

Les résultats exposés dans ce tableau confirment la conclusion du chapitre concernant la précipitation du phosphore à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien (chapitre IV), d'après laquelle le précipité obtenu à froid, contiendrait un léger excès de magnésie, en montrant que, seule, la précipitation à chaud est capable de fournir des résultats exacts.

MODIFICATION DE LA METHODE BAUZIL

Nous avons apporté à la méthode BAUZIL deux modifications :

1° La destruction de la matière organique par le mélange d'acide chlorhydrique et chlorate de potasse a été remplacée par la destruction nitrico-magnésienne.

2° La précipitation à froid, a été remplacée par la précipitation du phosphate-ammoniaco-magnésien à chaud, d'après la technique SCHMITZ, décrite plus loin (Chap. IV).

Les cendres de la destruction nitrico-magnésienne effectuée sur 50 cm³ d'urine, complètement solubles dans 2 cm³ d'acide chlorhydrique, additionnés de quelques cm³ d'eau ont été précipitées à chaud, à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. Le précipité, lavé à l'eau ammoniacale et à l'alcool, a été titré par de l'acide chlorhydrique N/10.

La liqueur reste toujours trouble, malgré l'excès d'acide et

ne donne pas le résultat attendu parcequ'il y a une surcharge de sels, introduits par la destruction ; la présence de cet excès trouble l'équilibre de la réaction, car 50 cm³ dosés d'après la précipitation Bauzil nécessitent 31 cm³ d'acide chlorhydrique N/10, tandis que dans notre cas, ce chiffre est de beaucoup dépassé et même après l'addition de 40 cm³ d'acide N/10, on n'arrive pas à la fin de la réaction.

Nous avons remédié à cet inconvénient.

L'addition à la liqueur du réactif magnésien et chlorhydrate d'ammoniaque a été supprimée, l'azotate de magnésie introduit pour la destruction les remplaçant grâce à l'addition d'une quantité équivalente d'acide chlorhydrique et d'ammoniaque.

La quantité d'ammoniaque nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide destinée à la formation du chlorhydrate d'ammoniaque et à alcaliniser en même temps le milieu de la réaction a été fixée à 16 cm³ d'ammoniaque pour 9 cm³ d'acide chlorhydrique pur.

La forme d'application sur les urines se résume donc comme suit :

50 cm³ d'urine sont soumis à la destruction nitrico-magnésienne, le résidu obtenu est dissous par 9 cm³ d'acide chlorhydrique, la solution est complétée à 50 cm³ avec de l'eau et divisée en 2. Une partie, transvasée dans un récipient à précipitation chaude, de 150 cm³, est neutralisée par l'ammoniaque, de façon que le liquide soit encore légèrement acide.

On chauffe, sur une toile métallique, au-dessus d'un bec Bunsen, et on ajoute, goutte à goutte, à l'aide d'une burette, placée au-dessus, de l'ammoniaque dilué (technique Schmitz) jusqu'à précipitation complète des phosphates, indiquée par le dégagement de l'odeur ammoniacale.

Le précipité, recueilli après l'addition de 5 cm³ d'ammoniaque, est lavé et titré par l'acide chlorhydrique N/10, en présence d'hélianthine.

Voici les résultats obtenus :

Urine N°	P ₂ O ₅ Gr. obtenu par litre		Urane
	Méthode Bauzil à froid	Méthode Bauzil modifiée à chaud	
1	2,954	2,907	2,883
2	2,364	2,265	2,239
3	1,029	0,966	0,974

Bien que BALAREWS (22) critique les résultats obtenus à chaud et prétend que le précipité contient encore un excès de magnésie, il résulte de ces trois expériences que les chiffres que nous avons obtenus à chaud, inférieurs à ceux obtenus à froid, coïncident sensiblement avec ceux obtenus par l'urane.

§ II. — DOSAGE A L'ÉTAT DE PHOSPHO-MOLYBDATE D'AMMONIAQUE.

La détermination de l'acide phosphorique sous forme d'une combinaison acide phospho-molybdique est basée sur le fait que l'acide phosphorique peut être séparé sous la forme d'un complexe, qui contient à la fois de l'ammoniaque ou un autre alcali, de l'acide phosphorique et du tri-oxyde de molybdène.

Voici les possibilités de dosage qui en résultent :

1° Le complexe est pesé tel que : dans sa totalité ou après sa transformation, par la calcination (méthode gravimétrique).

2° Il est traité par un excès connu d'alcali. On titre après sa dissolution, l'excès d'alcali non entré dans la réaction, et on en déduit la quantité de phosphore (méthode alcalinimétrique), ou bien, l'on dose l'ammoniaque par le formol (formol-titration).

A. — *Méthode gravimétrique*

La forme primitive pour le dosage du phosphore, dans le complexe phosphomolybdique a été la forme gravimétrique.

LORENZ (23) fut le premier qui appliqua au dosage du phosphore la précipitation à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque, en se servant, pour préparer le milieu acide, dans lequel il opérait la réaction, en même temps d'acide sulfurique et d'acide azotique.

Le précipité obtenu après le lavage à l'eau ammoniacale, à 20/0, déshydraté par l'alcool (éther ou acétone) a été dosé gravimétriquement.

NEUBAUER et LUCKER (24) vinrent confirmer l'exactitude des résultats obtenus par cette méthode.

La composition de ce complexe phosphomolybdique à l'heure actuelle, n'est pas complètement définie. De nombreux auteurs ont déterminé sa formule après la calcination.

HUNDESHAGEN (25) établit la suivante :



et trouve des chiffres exacts seulement par l'emploi du facteur empirique 0,03753.

NEUMANN (26), d'accord avec lui, admet pour chaque molécule de $P^2 O^5$, 24 molécules de MoO^3 .

D'après FINKENER et WOY, la formule du précipité séché à 160 ou 180° serait $12 Mo O^3, PO^4 (N H^4)^3$ et la substance contiendrait théoriquement 3,784 0/0 de $P^2 O^5$ et 1,6635 0/0 de phosphore.

Le facteur théorique pour le calcul du $P^2 O^5 = 0,0378$, mais ils trouvent des chiffres exacts avec le facteur empirique 0,03794.

WOY constate que si le précipité est moins chauffé, il correspondrait à la composition $20 Mo O^3, P^2 O^5$, qui contient 3,949 0/0 de $P^2 O^5$ et 1,7254 0/0 de phosphore.

LORENZ se propose de peser le précipité sans l'avoir calciné, tout simplement après sa déshydratation et trouve le facteur 0,03295.

Quoiqu'il en soit, il est démontré que'n opérant toujours dans les mêmes conditions, avec les mêmes réactifs, on arrive à obtenir des précipités de même composition.

Le poids considérable de précipité obtenu par rapport au phosphore mis en œuvre (60 fois), permet de l'employer pour le dosage de très petites quantités de phosphore.

PREGL (27), utilisant les données des auteurs antérieurs, en a tiré une microméthode gravimétrique du phosphore, par laquelle on peut doser des quantités extrêmement faibles de phosphore organique. 0 mg. 03 de $P^2 O^5$.

Il opère de la façon suivante :

« Le filtrat (ou la solution phosphorique) additionné de 2 cm³ d'un mélange d'acides nitrique et sulfurique, complété à 15 centimètres cubes, est chauffé au bain-marie, on agite fortement la solution chaude, on y verse 15 cm³ de sulfate molybdique, en évitant de faire couler le liquide au long des parois du tube, puis on laisse reposer 3 minutes, on agite de nouveau une demi-minute, et on laisse une heure au repos avant de passer à la filtration. »

Pour recueillir et sécher le précipité, il se sert d'un tube filtrant et sèche le précipité dans un dessiccateur dans lequel on a

fait le vide d'au moins 150 millimètres, au moyen d'une trompe.

Sur des dosages effectués, en se servant d'une solution de $\text{PO}_4 \text{NH}_4 \text{NaH}$, 4 H_2O , il trouve, comme moyenne de six opérations, la quantité de $\text{P}_2 \text{O}_5$ du précipité égale à 3,3326 0/0 est du phosphore à 1,4524 0/0.

Il prend comme facteur de transformation de l'acide phosphorique en $\text{P}_2 \text{O}_5$, 0,03326 et pour le phosphore 0,014524, chiffres un peu supérieurs à ceux trouvés par LORENZ dans le macrodosage.

Voici quelques-uns de nos résultats obtenus suivant cette technique. Nous avons remplacé le tube filtrant par un tube à centrifuger et le séchage à vide par le séchage à l'étuve. Le précipité obtenu a été lavé à l'aide d'une solution d'azotate d'ammoniaque, et déshydraté par l'alcool et l'éther, puis maintenu pendant une heure à l'étuve à une température de 100°.

Prise d'essai en $\text{P}_2 \text{O}_5$ mgs.	Phospho- molybdate attendu en mgs.	Phospho- molybdate trouvé en mgs.	$\text{P}_2 \text{O}_5$ corres- pondant en mgs.	Diffé- rence %
2,058	61,7	{ 61,4 61,6	{ 2,046 2,053	— 0,5 — 0,3
1,026	30,8	{ 30,6 30,7	{ 1,02 1,023	— 0,5 — 0,2
0,513	15,4	{ 15,2 15,3	{ 0,051 0,051	— 0,16 — 0,16

§ III. — ALCALINIMÉTRIE DU PHOSPHOMOLYBDATE D'AMMONIAQUE.

Principe : La méthode alcalinimétrique consiste à dissoudre le phosphomolybdate d'ammoniaque bien lavé dans une solution titrée d'alcali, à chasser l'ammoniaque, et à doser en retour l'excès d'alcali par une solution d'acide.

De nombreux auteurs se sont servis de ce principe, afin de doser le phosphore du phosphomolybdate, chacun d'eux adoptant des procédés différents.

Jusqu'à NEUMANN (27) la méthode n'a pu être mise en pratique, à cause de l'ammoniaque qui, en présence de phtaléine, comme on sait, retarde le virage et avec du tournesol donne, une réaction amphotère.

Il a su remédier à cet inconvénient, en chassant l'ammoniaque

par l'ébullition, et, de plus, en effectuant la précipitation en présence d'une solution d'azotate d'ammoniaque à 10 0/0, surmontant ainsi le second obstacle dû au précipité qui, obtenu par les méthodes antérieures, était difficilement séparable de la solution, car celle-ci restait toujours jaune à cause de la solubilité du phosphomolybdate.

GREGERSEN (28) reprend l'étude de la méthode et après quelques modifications, en conclut que la méthode est applicable jusqu'aux quantités de un milligramme de $P_2 O_5$.

HEUBNER (29) critique les résultats de Gregersen et de Neumann et constate qu'on peut obtenir des résultats concordants à condition de remplacer le facteur théorique de 0,553 par un autre empirique 0,57.

TAYLOR et MILLER (30) utilisent cette méthode pour le dosage du phosphore dans les éléments biologiques, de la façon suivante : La substance organique, contrairement à Neumann, est détruite par du carbonate alcalin, le résidu repris par de l'acide azotique est traité par le réactif molybdique, le précipité, lavé et centrifugé, est dissous dans un excès de soude, l'ammoniaque chassé par l'ébullition et retitré par un acide N/10. Toutefois, ils n'ont pu obtenir de résultats satisfaisants qu'en diminuant le facteur.

RAPER constate que l'excès de réactif molybdique apporte des changements dans l'exactitude des résultats attendus. Avec 2 cm³ de réactifs, l'erreur par excès en molybdène, trouvée dans le précipité, est de 1 à 5 0/0. Avec une quantité plus grande, l'erreur peut atteindre 15 0/0.

KLEINMANN (31) lave le précipité avec de l'alcool à 50° et constate que, même au commencement du lavage, des quantités faibles passent au travers du filtre, mais, avec le même alcool distillé après addition de permanganate de potasse et de chaux, il obtient satisfaction. Il critique les affirmations de Rapper et prétend que, quoique le phosphore soit un peu chargé d'un excès de molybdène, jusqu'à 1 mg. $P_2 O_5$ ceci ne peut apporter aucune influence sur le dosage.

Il conclut que les résultats exacts qu'on obtient cependant sont explicables seulement par la compensation de la perte en phospho-molybdate qui reste fixé aux parois du tube à centrifuger.

Il remplace le tube à centrifuger par le filtre, et ajoute, après la précipitation, 2 cm³ d'alcool, et puis il titre avec une solution d'acide sulfurique N/20.

Jusqu'à 1 mg. de P² O⁵, il constate que les résultats sont exacts ; pour des quantités inférieures, la différence serait de 2 0/0.

APPLICATION DE LA METHODE AU MICRODOSAGE DU PHOSPHORE

Afin de vérifier l'application de cette méthode, nous avons opéré quelques dosages, sur une solution de phosphore type, en adoptant comme technique, celle par différence, décrite récemment dans un travail concernant le microdosage alcalinimétrique du phosphore par KUHN (32), qui préconise la technique suivante :

On précipite le phosphore dans un vase à précipitation chaude d'après LORENZ et PREGL, à l'état de phosphomolybdate.

On laisse le précipité au repos pendant la nuit, ensuite on le filtre et on le lave 3 fois, à l'aide d'une pissette, avec de l'alcool à 50° glacé. Puis le précipité est dissous dans de la soude N/20 environ le double de la quantité nécessaire et porté à l'ébullition de façon à réduire à environ 10 cm³, on ajoute ensuite 5 gouttes de phénolptaléine à 5 0/0, et 3 à 5 cm³ d'acide sulfurique N/20 ; on fait bouillir à nouveau, et après refroidissement dans un courant d'eau froide, on titre avec de la soude N/20 jusqu'à la coloration rose. Il étend l'application de la méthode jusqu'à 0 mg. 1, mais, pour les quantités plus faibles, étant obligé de se servir d'une solution de soude de N/50, il recommande la voie pondérale.

Nous avons essayé cette méthode, mais comme le précipité de phosphomolybdate se détache difficilement de son filtre, nous l'avons dilacéré (filtre et contenu) avec quelques cm³ d'eau, puis dissous dans 10 cm³ de soude et après ébullition, retitré par l'acide chlorhydrique. En opérant ainsi, les chiffres obtenus ont été légèrement inférieurs à la réalité ; au lieu de 2 mg. P² O⁵, nous avons trouvé 1 mg. 80 et 1 mg. 86.

Le virage ne peut être précis, étant gêné par la présence de l'acide carbonique.

KLEINMANN vérifie l'élimination complète de l'acide carbonique ainsi :

Après élimination de l'ammoniaque par l'ébullition, la liqueur est acidifiée par l'acide sulfurique et retitrée à la soude.

L'absence de l'acide carbonique est contrôlée par une nouvelle addition d'acide suivie d'un titrage à la soude, l'opération doit être recommencée deux ou trois fois, jusqu'à ce que la quantité d'acide ajoutée se retrouve constante dans le titrage.

Les résultats obtenus dans ce cas sont légèrement supérieurs, l'erreur par excès serait due aux réactifs, qui ne sont pas parfaitement purs.

D'un autre côté, la légère solubilité de précipité, malgré l'alcool à 50° glacé employé, et la présence de l'acide carbonique qui retarde l'opération, rend la méthode difficilement applicable au dosage de petites quantités de phosphore.

On est obligé de recourir à l'emploi d'un facteur empirique, déterminé suivant les circonstances, la technique adoptée et l'état de pureté des réactifs, sinon les chiffres obtenus n'expriment qu'approximativement la quantité de phosphore existant.

A cause de ces difficultés, cette méthode ne nous a pas paru susceptible de s'appliquer au but que nous nous proposons.

LA TITRATION AU FORMOL

appliquée au dosage de l'acide phosphorique précipité à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque, par A. LEULIER (33).

Le principe de cette méthode de dosage est le suivant : Si on met en présence de l'aldéhyde formique et du chlorhydrate d'ammoniaque, il y a formation d'hexaméthylène-tétramine et mise en liberté de l'acide chlorhydrique. L'acide mis en liberté est ensuite titré par la soude N/10, en présence de la phénol-phtaléine, et l'on déduit l'ammoniaque.

C'est le procédé de RONCHÈSE pour le dosage de l'ammoniaque par le formol.

Pour précipiter le phosphore, il s'est servi de la technique WOY, telle quelle est décrite dans les traités de FRESSENIUS et TREADWELL, en la modifiant seulement en ce qui concerne le volume à donner aux solutions phosphoriques.

Pour des doses de 1 à 20 milligrammes P² O⁵ la solution doit avoir un volume de 10 cm³.

Pour des doses de 10 à 20 milligrammes P² O⁵ la solution doit avoir un volume de 30 cm³.

Pour des doses de 20 à 100 milligrammes P² O⁵ la solution doit avoir un volume de 50 cm³.

en se servant pour les concentrations en P² O⁵ comprises entre 1 et 5 milligrammes d'une solution titrée de soude N/20 entre 5 et 50 milligrammes N/10 et 50 et 100 milligrammes N/2.

Les proportions de réactif sont calculées comme suit :

Pour précipiter :

0 gr. 1 P² O⁵ il faut employer 120 cm³ de molybdate, 30 cm³ N O₃ NH₄ et 19 cm³ NO₃ H.

0 gr. 01 P² O⁵ il faut employer 15 cm³ de molybdate, 20 cm³ N O₃ NH₄ et 10 cm³ NO₃ H.

0 gr. 005 P² O⁵ il faut employer 15 cm³ de molybdate, 20 cm³ N O₃ NH₄ et 10 cm³ NO₃ H.

0 gr. 002 P² O⁵ il faut employer 10 cm³ de molybdate, 15 cm³ N O₃ NH₄ et 5 cm³ NO₃ H.

0 gr. 001 P² O⁵ il faut employer 10 cm³ de molybdate, 15 cm³ N O₃ NH₄ et 5 cm³ NO₃ H.

Voilà comment il opère :

50 cm³ de solution phosphorique neutre ou légèrement acidifiée par l'acide azotique contenant, au maximum, 0 gr. 10 et au minimum 0 gr. 001 de P² O⁵, sont versés dans un vase avec 30 cm³ d'azotate d'ammoniaque et 10 à 20 cm³ d'acide azotique, on chauffe à l'ébullition, dans un autre vase, on chauffe la quantité correspondante de réactif molybdique, dans ce cas, 120 cm³.

On fait couler, en mince filet, le réactif chaud, dans la solution phosphorique, et, après un quart d'heure, le précipité de phospho-molybdate est soumis au traitement suivant, afin de doser l'ammoniaque qu'il contient, par le formol.

Le précipité est recueilli sur un filtre et lavé une première fois, avec une solution glacée contenant 1/20 de réactif molybdique, puis avec de l'eau très refroidie dans la glace, jusqu'à ce que la liqueur filtrée ne donne plus qu'une teinte jaune très pâle, avec le réactif de NESSLER (5 ou 6 lavages pour des doses de 5-10 milligrammes).

Le précipité est introduit après avec le filtre dans un vase à

saturation, on dilacère le filtre à l'aide d'un agitateur et le précipité est mis en suspension dans l'eau, on dissout ce précipité dans de la soude q. s., on revient à une légère acidité par l'acide sulfurique en présence de phénolphthaléine, puis à une teinte légèrement rose avec de la soude qui sert au titrage final.

C'est alors qu'on verse du formol neutre au demi 10 cm³ pour 1 à 20 milligrammes de P² O⁵, 20 cm³ pour 50 et 40 cm³ pour des chiffres au-dessus.

Etude critique de la méthode

Dans plusieurs dosages que nous avons effectués, sur des petites quantités de P² O⁵ (1-10 milligrammes) nous avons constaté qu'après 5 ou 6 lavages, à l'eau glacée de 1cm³ chacun, le filtrate présente toujours une réaction très marquée avec le réactif de NESSLER.

Le précipité est légèrement soluble, dans l'eau glacée et même souvent, dès le commencement de l'opération, après deux ou trois lavages, passe à travers le filtre.

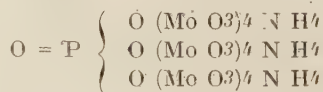
L'erreur oscille donc entre deux possibilités : ou l'ammoniaque n'est pas complètement éliminé et les chiffres obtenus sont supérieurs, ou bien, on arrive par le lavage à éliminer complètement l'ammoniaque, mais, de plus, on risque la dissolution du précipité et, en conséquence, des chiffres inférieurs, comme résultat.

C'est pourquoi nous avons pensé à doser l'ammoniaque dans le précipité de phosphomolybdate obtenu par la méthode de PREGL, desséché à l'alcool et l'éther, et maintenu à l'étuve pendant une heure, à 100°.

Les résultats sont alors bien plus élevés.

L'auteur de la méthode par formol-titration a fait les calculs, selon le fait que dans le précipité, 3 molécules d'ammoniaque correspondent à 1/2 molécule de P² O⁵.

Nous avons pensé, à substituer dans la molécule de phosphomolybdate, dont la formule serait, d'après LEULIER, un complexe triammonique.



les trois molécules d'ammoniaque par 3 1/2, et 4 molécules. En changeant le facteur, après avoir tenu compte de cette substitution, nous avons pu faire disparaître presque totalement l'erreur par excès, mais le facteur à utiliser paraît un peu variable, selon la concentration de la solution phosphorique, le meilleur semble être celui correspondant à 3 molécules 1/2 d'ammoniaque.

Voici les résultats que nous obtenons en appliquant la technique LEULIER à des quantités différentes de $P_2 O_5$ précipitées d'abord à l'état de phosphomolybdate suivant la technique PREGL, séché à l'étuve à 100° et pesé.

Quantité en mgr. de $P_2 O_5$ existant dans le précipité de de phospho- molybdate après la pesée	Résultats en mgr. trouvés en employant		
	Facteur employé par Leulier	Facteur modifié correspondant	Facteur modifié correspondant
	à	à	à
	0 mol. 5 $P_2 O_5$	0 mol. 5 $P_2 O_5$	0 mol. 5 $P_2 O_5$
	3. mol. NH_4	3 mol. 5 NH_4	4 mol. NH_4
1,98	2,60	2,30	2,01
2,06	2,75	2,35	2,06
3,92	4,64	3,98	3,48
4,03	5,25	4,50	3,94
10,03	12,25	10,37	8,98
10,15	12,75	10,90	9,53

Nous avons pu obtenir des résultats plus satisfaisants en précipitant le phosphore d'après PREGL, et en lavant le précipité avec de l'eau à l'azotate d'ammoniaque et de l'alcool à 95°, le précipité est légèrement soluble dans l'alcool, mais en prenant comme limite conventionnelle une légère teinte produite par le filtrat avec le réactif de NESSLER, les résultats sont plus précis.

En voici quelques-uns :

Prise d'essai en mgs de P ₂ O ₅	Nombre de cm ³ de soude N/20 employés dans la titration au formol	P ₂ O ₅ obtenus en mgs	Différence
1,02	0,85	1,03	+ 0,9
	0,90	1,10	+ 7,8
2,05	1,55	1,89	— 7,8
	1,65	2,01	— 1,8
4,11	3,3	3,93	— 4,3
	3,4	3,93	— 4,3

Il faut observer encore que le nombre de cm³ trouvé doit être augmenté par la correction de 1/30, correction dont nous avons fait usage, dans tous les calculs que nous avons exposés, afin de remédier à l'inconvénient du virage à la phthaléine retardé un peu à cause des sels d'ammoniaque.

De ce dernier tableau, résulte que dans le cas où le lavage à l'eau a été remplacé par le lavage au nitrate d'ammoniaque et l'alcool, les résultats sont plus précis.

Mais la méthode devient inapplicable aux quantités de P₂ O₅ inférieures à 1 milligramme.

§ IV. — DOSAGE DU PHOSPHORE PAR LA COLORIMÉTRIE.

En 1889, JOLLES (34), essaya, le premier, de doser le phosphore contenu dans le phosphomolybdate d'ammoniaque par la colorimétrie. Il se servit d'un appareil spécialement préparé, appelé : « phospha-méter ».

La base de cette méthode colorimétrique est, en principe, la réduction du Mo O₃ en un oxyde de molybdène inférieur.

TAYLOR et MILLER ont montré que les sels d'hydrazine sont spécialement favorables à cette réduction du Mo O₃ en bleu de molybdène.

RIÉGLER (39) tenta, en 1915, d'effectuer la réduction du molybdate d'ammoniaque par la chaleur, avec du sulfate d'hydrazine, tandis que les auteurs précédents faisaient la réduction avec du chlorhydrate de phénylhydrazine.

Leur technique est la suivante :

Le phosphomolybdate d'ammoniaque est dissous dans la

soude, on traite après la solution avec de la phénylhydrazine, et on compare ensuite la teinte bleue obtenue, avec un échantillon type préparé avec du phosphate monopotassique, molybdène, soude, phénylhydrazine et acide sulfurique.

SATO (35), en se basant sur la coloration que donne le phosphate d'uranyle, avec le ferrocyanure de potassium, a tenté d'établir une méthode colorimétrique pour le dosage du phosphore urinaire. Il dissout le précipité de phosphate d'uranyle dans l'acide, et la coloration obtenue par l'addition du ferrocyanure à la solution, est comparée avec l'échantillon type préparé de la même façon.

KLEINMANN, en se servant de l'idée émise la première fois par TAYLOR, dose par la colorimétrie, l'ammoniaque contenu dans le phosphomolybdate.

Il emploie un réactif préparé avec 75 gr. d'iodure de potassium, 50 cm³ d'eau chaude et 100 gr. d'iodure de mercure.

Il constate que la teinte est belle, et la méthode applicable avec précision jusqu'à concurrence de 1 mg. P² O⁵

RUDOLPH NAMIAS établit une méthode colorimétrique basée sur la complète solubilité du phosphomolybdate dans une solution chaude de thiosulfate de soude avec formation d'une teinte bleue intense.

Misson (36) présente une méthode basée sur la propriété que possède le vanadate d'ammoniaque de produire avec le phosphomolybdate d'ammoniaque une coloration jaune brune.

Il dose jusqu'à 0 mg. 3, 0 mg. 4 de P² O⁵.

KLEINMANN reprit l'étude des dérivés colorés du molybdène et essaya de provoquer la réduction en présence de sulfo-cyanate de potasse, en milieu acide, par la phénylhydrazine, le sulfate d'hydrazine, le zinc et le chlorure stanneux.

Il essaya d'utiliser la réaction du tanin avec du phosphomolybdate de soude, qui donne une teinte rouge-jaune, ainsi que la réduction du molybdène par divers phénols, acide gallique, pyrocatéchine, pyragallol, susceptibles de donner avec le molybdène des dérivés colorés.

D'après lui, la résorcine, le gaïacol, l'hydroquinone, la phloroglucine, au contraire, ne donnent pas de coloration.

Ses résultats sont négatifs, car il conclut sur l'impossibilité d'utiliser la teinte du tanin et des phénols dans la colorimétrie.

Au contraire, la teinte jaune brune que produit le molybdène en milieu acide, avec le ferrocyanure de potasse, serait absolument favorable et indiquée pour fournir les bases d'une méthode colorimétrique.

Il remplace l'influence gênante de l'ion d'ammonium, par le molybdate de soude, et présente une méthode avec laquelle il a pu doser des quantités de $P^2 O_5$ extrêmement faibles, jusqu'à 0 mg. 10, avec une erreur de 0,5 0/0. Pour doser 0,05 de $P^2 O_5$, l'erreur est plus grande et, pour des quantités encore inférieures, la méthode est inapplicable.

METHODE COLORIMETRIQUE BELL ET DOISY

Cette méthode a été appliquée, pour la première fois, au dosage du phosphore organique urinaire, par YOUNGBURG et PUCHER. D'après eux, les résultats obtenus seraient satisfaisants et la méthode applicable jusqu'à 0 mg. 01 de $P^2 O_5$, donc à de très faibles quantités.

Le fait que certaines substances réductrices telle que l'hydroxylamine et divers phénols ne réduisent pas l'acide molybdique, mais réduisent parfaitement l'acide phosphomolybdique, constitue en principe la base de leur méthode.

En réalité, cette observation a été utilisée la première fois par RICHARD BELL et EDWARD DOISY. C'est, en somme, la réaction inverse de celle de FOLIN et DENIS qui caractérisent les phénols au moyen d'une solution phosphomolybdique. FOLIN et DENIS opèrent avec un excès d'acide phosphomolybdique, alors que BELL et DOISY opèrent avec un excès d'hydroquinone, pour le dosage colorimétrique de l'acide phosphorique.

Elle diffère de la méthode DENIGÈS, méthode que nous décrivons plus loin, dans laquelle on opère la réduction du molybdène en milieu acide par le chlorure stanneux, par le fait que la réduction du molybdate est effectuée en milieu alcalin, par l'hydroquinone. La teinte bleue ainsi obtenue est rendue plus intense par un alcali (carbonate de soude) et l'inconvénient dû à la formation du quinone, qui provoque une teinte verdâtre est évité par le sulfite de soude.

*Contrôle de la méthode par son application aux dosages
du phosphore minéral*

On prépare d'abord les réactifs nécessaires :

Une solution d'acide molybdique, d'hydroquinone et de carbonate sulfite, préparée suivant les recommandations de BELL et DOISY, les initiateurs de la méthode.

1). *Acide molybdique*. — 50 gr. de molybdate d'ammoniaque sont dissous dans un litre d'acide sulfurique normal, exempt de phosphore. 5 cm³ de ce réactif, traités par 5 cm³ d'hydroquinone et, 5 minutes après, par 25 cm³ de solution de carbonate et de sulfite, doivent rester complètement incolores.

2) *Solution d'hydroquinone*. — 20 grammes d'hydroquinone pure, dissous dans un litre d'eau, et additionnés d'un cm³ d'acide sulfurique.

3) *Solution de carbonate sulfite*. — 2.000 cm³ d'une solution à 20 0/0 de carbonate de soude sont mélangés avec une solution de 75 gr. de sulfite de soude dans 500 cm³ d'eau.

4) *L'ammoniaque*, qui souvent contient du phosphore, est purifié par distillation et dilué au demi.

Puis, la solution à examiner est placée dans un tube jaugé de 25 cm³ environ, et comparée avec l'étalon type préparé comme suit :

Dans un autre tube semblable au premier, on met 5 cm³ de la solution phosphorique, contenant environ la même quantité de P² O⁵ que celle qu'on présume exister dans la solution à examiner.

On doit éviter une trop grande différence de teinte entre les deux solutions afin d'assurer la plus grande précision possible.

Cela fait, on ajoute, dans les deux tubes, 5 à 6 gouttes d'acide sulfurique, 1 cm³ d'hydroquinone et 2 cm³ de réactif molybdique. Cinq minutes après, on ajoute 10 cm³ de carbonate-sulfite et on complète le volume à 25 cm³, après quoi on fait la lecture au colorimètre Duboscq, sous une hauteur de 300 mm.

Voilà les résultats que nous obtenons en opérant ainsi sur des quantités différentes de P² O⁵ minéral comparées avec un type échantillon très voisin.

	Type de comparaison		P ₂ O ₅ à doser en mgs.	P ₂ O ₅ trouvé en mgs.
	en mgs.	P ₂ O ₅		
1	0,190		0,205	0,204
2	0,095		0,103	0,103
3	0,047		0,051	0,049

LA METHODE CÆRULEO-MOLYBDIQUE

DENIGES (37) décrit une méthode appelée coeruleo-molybdique, susceptible de doser un millièrme de milligramme de phosphore, basée sur le fait suivant :

Lorsqu'à un certain volume d'eau (5 cm³ par exemple), on ajoute quelques gouttes d'une solution à 10 0/0 de molybdate d'ammoniaque et quelques gouttes d'une solution de chlorure stanneux renfermant 1 0/0 environ de stannosum, on obtient une coloration bleue fournie par l'oxyde salin de molybdène.

L'influence de l'acide chlorhydrique et sulfurique empêche la formation du bleu, mais si ce mélange, quoiqu'acidulé au-delà de la limite, où pris seul il ne donne plus de bleu avec du chlorure stanneux, est additionné d'un phosphate dissous, on constate qu'une teinte bleue stable apparaît, dès qu'on a fait intervenir le réducteur.

Elle a été utilisée, déjà, par un certain nombre d'auteurs, et particulièrement par GRIGAUT (38), pour le dosage de la léci-thine dans le sang, et a donné des résultats satisfaisants.

Nous avons profité de la technique, dont s'est servi GRIGAUT et, en y apportant certaines modifications, nous l'avons adaptée au dosage du phosphore organique urinaire.

Les réactifs nécessaires sont :

1° Réactif sulfo-molybdique, préparé en mélangeant des parties égales de solution de molybdate d'ammoniaque à 10 0/0 et d'acide sulfurique pur à 66°.

2° Réactif stanneux préparé en dissolvant au bain-marie bouillant et en agitant 0 gr. 10 d'étain en feuilles dans 2 cm³ d'acide chlorhydrique pur et concentré, et complétant à 10 cm³ au moyen d'eau distillée. Ce réactif doit être renouvelé tous les 4 ou 5 jours.

Nous avons contrôlé son application sur des solutions très faibles de phosphore minéral. Les résultats sont comparative-

ment presque les mêmes que ceux que nous obtenons par la méthode BELL et DOISY, à condition de faire la comparaison avec des solutions types ayant une teneur très voisine en $P^2 O_5$.

Elle présente, en plus, un grand avantage, c'est l'intensité de la teinte obtenue, qui est beaucoup plus marquée que dans la méthode de BELL et DOISY.

Voici notre technique :

1 cm³ du filtrat obtenu après la séparation des phosphates minéraux à chaud, introduits dans un petit creuset en porcelaine, est additionné de 8 gouttes d'acide azotique, de 3 gouttes de solution saturée d'azotate de magnésie et, ensuite, soumis à la calcination, suivant les règles générales décrites dans le chapitre concernant la destruction de la matière organique et la séparation du phosphore minéral. (Ch. III.)

Si l'urine est trop faible en phosphore organique, on est obligé d'augmenter la quantité du filtrat mis en œuvre de 1 à 2 cm³ et, de même, proportionnellement, les réactifs.

Le résidu obtenu après la calcination est dissous, dans quelques cm³ d'eau distillée acidulée par 3 gouttes d'acide sulfurique. La solution est ensuite versée dans un tube gradué en cm³ et neutralisée en présence d'une goutte de phenolphthaleïne avec de la soude pure et diluée. On note le nombre de cm³ employés.

La solution type est alors préparée comme suit :

Dans un autre tube gradué, on verse la solution phosphorique renfermant environ 0 mg. 01 à 0 mg. 02 de $P^2 O_5$ minéral, selon la teneur présumée dans le filtrat, et la même quantité de soude égale à celle utilisée précédemment, et on neutralise au moyen d'acide sulfurique, en présence d'une goutte de phenolphthaleïne.

Dans la colorimétrie, une cause d'erreur des plus importantes, et qui peut apporter de grandes variations dans les résultats, est l'influence de certains facteurs, tels que la concentration, en acide et divers ions étrangers.

L'ion d'ammonium nous semble jouer un rôle défavorable dans la réaction, ce qui nous a obligés d'employer pour neutraliser l'acide sulfurique, une solution diluée de soude pure.

Une fois l'équilibre établi, on complète à 10 cm³ avec de l'eau et on ajoute successivement les réactifs, 0 cm³ 4 de réactif molybdique et 0 cm³ 1 de réactif stanneux.

Deux à trois minutes après, la teinte bleue obtenue atteint son maximum, et l'on peut doser au colorimètre.

Comme nous allons voir, il y a des urines très pauvres en phosphore organique, sur lesquelles le dosage est impossible par la méthode de BELL et DOISY.

Au contraire, la méthode coeruleo-molybdique, dans ces cas, est la méthode préférée, car elle donne des résultats satisfaisants. La teinte parfaitement distincte au colorimètre, qu'on obtient par cette méthode, avec 0 mg. 01 de $P^2 O^5$, ne peut pas même s'obtenir, par la méthode de BELL et DOISY, avec 0 mg. 05 $P^2 O^5$, soit une quantité 5 fois supérieure.

CONCLUSION

Vu les difficultés que nous avons rencontrées dans l'application des microméthodes étudiées jusqu'ici, pour le dosage du phosphore, la nécessité pratique imposait de plus en plus la recherche d'une méthode susceptible de pouvoir en doser des quantités extrêmement faibles et qui soit à la fois simple et rapide, tout en restant suffisamment exacte.

De ce chapitre résulte que la colorimétrie nous a paru réaliser tout à fait ces conditions, nous l'avons adoptée pour nos recherches, sous la forme de BELL et DOISY, soit, de préférence, sous celle de DENIGÈS.

CHAPITRE III

DESTRUCTION DE LA MATIERE ORGANIQUE

Parmi tous les moyens utilisés jusqu'à présent, pour détruire les substances organiques urinaires, on a préconisé surtout la méthode de destruction par les carbonates et azotates alcalins et celle par le mélange sulfo-nitrique.

La destruction, par le carbonate-azotate alcalin, est d'un manière assez délicat, et attaque promptement le récipient, si celui-ci n'est pas en argent.

La destruction, par le mélange acide sulfo-nitrique, fut mentionnée, pour la première fois, en 1864, par MILLON (38), et utilisée, en 1889, par LAPICQUE (38), pour le dosage du fer dans le sang. Elle fut décrite à nouveau, en 1897, par NEUMANN, qui l'appliqua en 1902 à la destruction de la matière organique urinaire.

Quoiqu'elle soit applicable, avec succès, au dosage d'un certain nombre substances, elle présente cependant des inconvénients.

Dans le cas de la destruction des urines, par exemple, on est obligé d'employer, pour 50 cm³ d'urine, 10 cm³ d'acide sulfurique (20 cm³ pour les urines diabétiques ou autres), et au moins 20 à 30 cm³ d'acide azotique, selon la quantité de matières organiques à détruire.

On doit ensuite utiliser beaucoup d'ammoniaque pour neutraliser les acides. De plus, la destruction constitue une assez longue opération. Certains auteurs ont reproché à la méthode sulfo-nitrique d'amener des pertes en phosphore par volatilisation.

BAUMANN (39) a montré que le phosphore ne se volatilisait pas, lorsqu'il est chauffé seul à 260°, mais qu'à la même température, en présence de l'acide sulfurique, il se volatilise. Il a

trouvé, en appliquant cette méthode aux urines, une perte de 12 à 15 0/0.

Les nombreuses expériences, que nous avons faites, nous ont confirmé l'exactitude de cette remarque, tout au moins pour le cas que nous avons étudié, et nous ont déterminé à chercher une autre méthode, susceptible d'éviter la perte en phosphore.

On a tenté, à plusieurs reprises, de remplacer la destruction sulfo-nitrique, par l'incinération directe de la substance à détruire, avec différents oxydants et catalyseurs, susceptibles de faciliter la destruction.

Ainsi GENEUIL (41) a étudié la magnésie que MONTHULE avait antérieurement employée sous forme de nitrate, mais sans en généraliser l'emploi.

ESCHKA (42), en 1874, utilisa la magnésie et la soude (1 gr. pour 0 gr. 5 de soude pour la destruction de la houille).

VOZARIK s'en servit dans la destruction des aliments pour le dosage du phosphore et il trouva son emploi de beaucoup préférable à celui des nitrates alcalins et de la soude.

GAUTHIER, également, recourut à la chaux et à la magnésie pour la destruction des tissus dans la recherche de l'arsenic, tandis que KOHN ABREST, dans les destructions toxicologiques, préféra employer le nitrate de magnésie.

FONTES et THIVOLLE (43), combinant en quelque sorte la méthode de MILLON et celle de KOHN ABREST, sont parvenus à supprimer l'acide sulfurique dans le milieu d'attaque, et ont obtenu, après la destruction, des cendres sèches blanches, parfaitement solubles dans 1 ou 2 cm³ d'acide minéral.

Voici leur technique :

La substance à détruire, sous quelque forme qu'elle se présente, est dissoute dans un ballon Kjeldahl, en verre Pyrex, en présence d'une quantité d'acide azotique égale à environ son poids, et 1 ou 2 cm³ d'eau oxygénée à 10 volumes. L'addition d'eau oxygénée a pour but d'oxyder les vapeurs nitreuses et d'empêcher la formation des mousses.

On porte le tout à ébullition et, quand la dissolution est complète, on laisse refroidir, puis on ajoute 1 gr. environ de magnésie.

Pour continuer la destruction, les auteurs se sont servis d'un

bain métallique à 300° environ, mais ce n'est pas indispensable, tout autre moyen de chauffage peut convenir.

Les cendres, obtenues après cette première opération, sont rarement blanches. Il suffit alors, pour obtenir un résidu parfaitement blanc, d'y ajouter 5 à 10 cm³ d'acide azotique et d'évaporer de nouveau. On renouvelle ce traitement jusqu'à complet résultat.

On reprend ensuite ces cendres par 1 à 2 cm³ d'acide minéral (sulfurique, azotique, etc...) pour créer le milieu nécessaire à la suite des opérations, et selon la substance à rechercher.

En nous basant sur les indications de ces auteurs, nous avons essayé d'appliquer leur procédé à la destruction de la matière organique urinaire, en y apportant toutefois de légères modifications.

Dans la technique (dont nous ferons l'exposé détaillé dans le chapitre VI), la magnésie, qui souvent contient des traces de phosphore, a été remplacée par le nitrate de magnésie, produit généralement tout à fait pur, ou facile à purifier.

De même, l'eau oxygénée, qui n'est nullement indispensable a été supprimée, les résultats obtenus avec ou sans son emploi ayant été les mêmes, et, de plus, nous n'avions plus à nous préoccuper de la présence du phosphore contenu habituellement dans ce produit.

Nous donnons ici quelques expériences destinées à établir la validité de la méthode.

§ I. — EXPÉRIENCE POUR LE CONTROLE DE LA MÉTHODE DE DESTRUCTION NITRICO-MAGNÉSIENNE.

1) Pour le contrôle de son application, nous avons choisi, comme base, une expérience, faite à blanc, avec la solution phosphorique étalon (donc, une solution d'un titre déterminé, qui ne contienne pas de matières organiques). Dans ce cas, la quantité de phosphore contenue dans la prise d'essai doit être retrouvée intégralement après une destruction à blanc.

Voici comme nous avons opéré :

La substance à détruire, renfermant 0 mg. 2, 0 mg. 1, et 0. mg. 05 de P² O⁵, placée dans un creuset de porcelaine, a été

incinérée en présence de 10 gouttes de solution saturée de nitrate de magnésie et 2 cm³ d'acide azotique.

Le résidu de la calcination, repris par 12 gouttes d'acide sulfurique, est ensuite traité par les réactifs réducteurs ; 1 cm³ de réactif molybdique, 2 cm³ d'hydroquinone et, 5 minutes après, 10 cm³ de carbonate-sulfite et dosé au colorimètre (pour les détails voir Chapitre VI).

Nous avons obtenu :

Expérience N ^o	Quantité en mgs. de P ₂ O ₅ minéral ajoutée à la destruction	Quantité en mgs. de P ₂ O ₅ retrouvée après la destruction	Perte en %
—	—	—	—
1	0,2	0,199 0,206 0,193	— 0,5 + 3 — 3,5
2	0,1	0,099	— 1
3	0,05	0,048	— 4

2) Des expériences semblables ont été effectuées avec une solution de glycérophosphate.

La solution de glycérophosphate a été préparée avec du glycérophosphate de soude β pur, contenant 5 H² O, qui nous a été aimablement fourni par M. O. BAILLY, de façon qu'elle contienne 2 grammes de P² O⁵ exactement, par litre.

Elle a été titrée selon la méthode alcalinimétrique d'ASTRUC et IMBERT.

D'après cette méthode, 306 milligrammes de P² O⁵ de glycérophosphate de soude + 1/2 molécule d'eau, dissous dans 10 cm³ d'eau et additionnés de 2 gouttes d'hélianthine, doivent être neutralisés par 10 cm³ d'acide sulfurique N/10 (teinte sensible) ou 10 cm³ 4 (teinte rose franc).

Dans le dosage que nous avons effectué, sur une prise d'essai qui devrait être neutralisé, théoriquement, par 14,09 cm³, nous avons utilisé 14,15 cm³ d'acide N/10.

Trois expériences parallèlement effectuées sur la même prise d'essai, contenant 0 mg. 2 de P² O⁵ de glycérophosphate, donne, après la destruction, les chiffres : 0 mg. 196, 0 mg. 202 et 0 mg. 199, donc une erreur de : — 2, ÷ 1 et — 0,5 0/0.

Ces dernières expériences nous ayant donné des résultats sa-

tisfaisants, nous avons étendu le nombre des dosages sur les quantités suivantes de 4, 5, 6, 8 et 10 mgs de $P_2 O_5$, contenues dans un volume de 125 cm³ d'eau.

Voici nos résultats :

Expérience N ^o	Quantité de $P_2 O_5$ en mgs. contenue dans la solution avant la destruction	Quantité de $P_2 O_5$ en mgs. trouvée après la destruction	Perte en %
1	4	3,79	— 8,8
2	5	4,56	— 5,25
3	6	5,94	— 1
4	8	6,02	+ 0,3
5	8	7,83	— 2,1
6	10	9,86	— 1,4

avec une erreur moyenne de — 3,14 0/0.

§ II. — COMPARAISON AVEC LA DESTRUCTION SULFO-NITRIQUE SELON LA TECHNIQUE YOUNBURG ET PUCHER.

Nous avons tenu à comparer notre technique avec celle adoptée par YOUNGBURG et PUCHER, en opérant sur la solution de glycérophosphate de soude.

Possédant la technique exacte (voir Chapitre VI) de cette méthode, nous l'avons appliquée à la destruction de quantités suivantes de glycérophosphate de 0 mg. 20, 0 mg. 10 et 0 mg. 05 de $P_2 O_5$, d'un côté avec toutes les précautions possibles pour éviter la perte du phosphore, entraîné par les vapeurs, de l'autre côté, nous avons exagéré le chauffage, afin de porter cette perte à son maximum.

Les prises d'essai ont été en même temps additionnées d'un peu de substance organique (0 gr. 10 acide tartrique, par exemple), pour préciser l'influence que peut jouer cette matière dans la destruction et dans la colorimétrie.

Voici les résultats :

	Expérience N° 1	Expérience N° 2	Expérience N° 3
P2 O5 en mgs contenu dans la prise d'essai	0,20	0,15	0,050
P2 O5 en mgs trouvé après la destruction nitrico-magnésienne	0,204	0,102	0,049
Erreur %	+ 2	+ 2	- 2

P2O5 trouvés après la destruction sulfo-nitrique ...	Chauffage		Chauffage		Chauffage	
	modéré	fort	modéré	fort	modéré	fort
	=0,191	=0,169	=0,098	=0,087	=0,049	=0,040
Erreur %	-4,5	-15,3	-2	-13	-2	-20

Nous concluons, des résultats obtenus dans ces trois tableaux précédents que, dans le cas où on opère la destruction du glycérophosphate de soude, par le mélange nitrico-magnésien, les résultats sont peu différents de ceux obtenus par les acides sulfuriques et nitriques et c'est seulement dans le cas où l'opération a été conduite d'une façon brutale, par un fort chauffage, que la perte peut atteindre de 13 à 20 0/0.

L'explication résulte du fait que le glycérophosphate contient très peu de matière organique, dans ce cas, la destruction est obtenue très facilement avec un chauffage modéré. L'émission des vapeurs d'acide sera donc très faible et la perte en phosphore elle-même insignifiante.

Ce n'est plus le cas avec les urines, quand on les détruit par le mélange sulfo-nitrique.

Comme elles sont plus riches en matières organiques, la réaction se fait avec une violence plus grande, et malgré le chauffage le plus modéré et la plus grande précaution, il se produit un abondant dégagement des vapeurs blanches et, comme nous le montrons plus loin, la perte du phosphore devient également plus élevée et elle reste inévitable.

CHAPITRE IV

LES MOYENS USUELS DE SEPARATION ENTRE LE PHOSPHORE MINERAL ET LE PHOSPHORE ORGANIQUE

Cette séparation consiste à insolubiliser le phosphore minéral sous forme de phosphate d'uranyle, de calcium, de baryum, de fer ou sous celle de phosphate ammoniaco-magnésien, à séparer ensuite par la filtration, le précipité du liquide contenant la combinaison phosphorée.

Nous choisirons, comme point de départ de ce chapitre, le procédé le plus usité aujourd'hui, pour la séparation et le dosage des phosphates minéraux, le dosage classique à l'urane.

§ I. — SÉPARATION A L'URANE.

L'opération est conduite de la façon suivante :

50 cm³ de solution phosphorique à 2 gr. P² O⁵ 0/00 sont additionnés de 5 cm³ d'une solution de glycérophosphate de soude (contenant 10 mg. P² O⁵) et précipités à l'urane, en présence de cochenille, jusqu'au virage au vert.

Après refroidissement, le précipité est séparé par filtration, et le filtrat, soumis à la destruction nitrico-magnésienne, est dosé par la méthode Copaux. Nous avons, au préalable, vérifié que l'acétate de soude acétique, la cochenille et les traces d'urane n'avaient aucune influence sur la réaction.

Nous n'avons retrouvé que 4 mg. P² O⁵ au lieu de 10 mg., soit une perte de 60 0/0.

Cette perte vient de ce que le phosphore organique reste fixé au précipité gélatineux du phosphate d'uranyle, nous en avons fait la preuve par l'expérience suivante :

Nous avons pris 50 cm³ de la même solution phosphorique ayant une teneur de 102 mg. 8 de P² O⁵ qui, additionnés de

10 mg. $P^2 O_5$ du même glycérophosphate, ont été précipités à l'état de phosphate d'uranyle.

Ce précipité, dissous dans 20 cm³ d'acide azotique, complété à 100 cm³, a été versé dans une fiole jaugée. Nous avons dosé par la méthode COPAUX et avons obtenu, sur la dixième partie, 10,1 mg. au lieu de 10,2 mg. 8 que, théoriquement, nous aurions du retrouver.

Nous avons repris, d'autre part, un même précipité préparé parallèlement, et l'avons soumis, tel que, à la destruction, afin de transformer en acide phosphorique les 6 mg. de $P^2 O_5$ qu'il a retenus.

Le dosage nous a permis de retrouver une quantité de $P^2 O_5$ de 108 mgs, donc une quantité voisine des 6 mg. qui n'avaient pas pu passer dans le filtrat.

En renouvelant ces expériences, et lavant plusieurs fois le précipité, nous avons toujours enregistré cette perte d'environ 60 0/0.

Nous en avons déduit que, quoique cette méthode soit la méthode classique de séparation et dosage de l'acide phosphorique, elle ne pouvait nous donner satisfaction, et qu'elle était inapplicable à nos travaux, quant au but que nous poursuivons.

§ II. — SÉPARATION PAR LE CHLORURE DE CALCIUM.

D'après YOUNGBURG et PUCHER, le chlorure de calcium ne serait pas susceptible d'assurer la précipitation totale du phosphore minéral, dans une solution ou dans une urine, car ils dosent dans le filtrat 50 0/0 plus de phosphore, qu'après une précipitation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.

Nous avons tenté de vérifier cette affirmation. Nous avons pris 0 gr. 25 de phosphate monopotassique, qui additionnés de 60 mgs de $P^2 O_5$ à l'état de glycérophosphate de soude, alcalinisés par l'ammoniaque, ont été précipités ensuite, par une solution de chlorure de calcium à 10 0/0 (utilisant un léger excès de la quantité théorique).

Après formation du précipité, le tout a été complété à 100 cm³ puis filtré, traité par la destruction sulfo-nitrique. Nous avons, par la méthode Copaux, dosé sur 5 cm³ du filtrant, 1 mg. 7 au lieu de 3 mg. $P^2 O_5$, soit 43 0/0 de perte.

Et, en remplaçant le chlorure de calcium par un lait de chaux, nous avons enregistré une perte de 60 0/0.

§ III. — SÉPARATION PAR L'EAU DE BARYTE.

Les mêmes auteurs ont contrôlé également la possibilité d'effectuer la séparation par l'eau de baryte, et constaté qu'elle présente le même inconvénient, et, de plus, exige, pour obtenir une séparation totale, une quantité de beaucoup plus grande de réactifs que la quantité théorique. Ils trouvent que le phosphore organique resterait en grande partie fixé au précipité.

Nous avons également vérifié le fait sur 50 cm³ de solution phosphorique, additionnés de 10 mg. P² O⁵ à l'état de glycérrophosphate, précipités en milieu alcalin par un grand excès d'eau de baryte, nous n'avons retrouvé après séparation et destruction du filtrat que : 4 mg. 2 P² O⁵ au lieu de 10, soit une perte de 58 0/0.

§ IV. — SÉPARATION A L'ÉTAT DE PHOSPHATE AMMONIACO-MAGNÉSIEN.

Les travaux les plus anciens datent de FRESSENIUS et de MARKER qui effectuaient la précipitation en milieu ammoniacal par l'addition de la mixture magnésienne à froid.

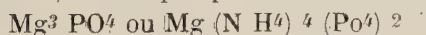
Ils diffèrent, l'un de l'autre, seulement dans la composition et la quantité des réactifs employés.

E.-W. PARMEL (31), en 1871, constata que le précipité obtenu contenait 8 0/0 de magnésie de plus qu'il ne devait, et que, malgré une seconde précipitation, il en restait encore 4 0/0, mais qu'en mélangeant les liquides, à l'état d'ébullition, on pouvait obtenir des résultats exacts.

NEUBAUER (31) critiqua les travaux antérieurs, et observa qu'en présence d'un excès de magnésie et d'ammoniaque, on obtenait un précipité contenant plus de magnésie, mais qu'en employant ces deux facteurs sans excès, on en trouvait moins.

Il conclut qu'on ne pouvait obtenir la véritable composition du phosphate ammoniaco-magnésien qu'avec un excès de magnésie seul, mais non d'ammoniaque.

Il constata également que le phosphate ammoniaco-magnésien obtenu à froid, n'était pas pur et contenait :



SCHMITZ (44) utilisant ces constatations, essaya d'effectuer la précipitation à chaud et décrit son procédé ainsi :

On traite la solution de phosphate alcalin par un peu d'acide chlorhydrique, on y ajoute un grand excès de mixture-magnésienne et 10 à 20 cm³ d'une solution saturée de chlorure d'ammonium, on chauffe jusqu'à commencement d'ébullition. Puis on fait couler lentement (environ 4 gouttes par minute) en agitant constamment, de l'ammoniaque à 2 1/2 0/0, jusqu'à ce que le précipité commence à se former. Il faut veiller à ce que, dès sa formation, il soit cristalin et s'il apparaît un trouble laiteux, il faut le redissoudre dans l'acide chlorhydrique

Pendant la formation du précipité, on continue à ajouter de l'ammoniaque jusqu'à dégagement de son odeur caractéristique, on laisse alors refroidir, on additionne encore de 1/5 de son volume d'ammoniaque concentrée et, 10 minutes après, on peut filtrer. Il dit avoir eu toujours des résultats exacts.

Quelques expériences comparatives nous ont montré que c'était la méthode de précipitation à chaud qui semblait devoir nous permettre d'obtenir des résultats satisfaisants et nous avons entrepris l'étude de son application.

Nous nous sommes posés, tout d'abord, un problème d'une importance capitale.

1° La précipitation de l'acide phosphorique est-elle complète et le phosphate ammoniaco-magnésien totalement insoluble ?

2° La séparation du phosphore organique est-elle intégrale, ou le phosphore reste-t-il plus ou moins fixé au précipité, comme dans les méthodes précédentes ?

Les résultats des travaux de KLEINMANN semblent résoudre définitivement la première question. Il constate, en effet, que sur une solution de 50 cm³ contenant 1 mg. P₂ O₅ précipitée, indifféremment à chaud ou à froid, 0 mg. 006 seulement ne sont pas précipités et, sur des quantités inférieures, seulement 0 mg. 003, donc une quantité tout à fait négligeable.

Nous répondons à la seconde question ainsi. Au cours des expériences parallèles, la précipitation a été effectuée, d'un côté, à froid, de l'autre, à chaud, et le glycérophosphate a été ajouté dans un cas, avant, dans l'autre après la précipitation.

Précipitation à chaud. — Sur 50 cm³ de solution phospho-

rique additionnés de 10 mg. de $P^2 O^5$ de glycérophosphate précipités d'après la technique BAUZIL, le filtrat réuni aux eaux de lavage et le tout détruit, nous avons retrouvé : 9 mg. 1 de $P^2 O^5$ au lieu de 10, soit une perte de 9 0/0.

Sur la même solution traitée semblablement, mais dans laquelle le glycérophosphate a été ajouté après la précipitation, nous avons retrouvé les 10 mgs de $P^2 O^5$.

Précipitation à chaud. — Et, dans la précipitation à chaud, les deux opérations effectuées de même façon, nous avons retrouvé, sur l'une et sur l'autre, les 10 mgs de $P^2 O^5$.

Nous en avons conclu que la séparation n'était donc intégrale que quand elle était opérée à chaud et nous pouvons affirmer que la précipitation à l'état de phosphate ammoniacomagnésien à chaud, constitue le moyen le plus complet qui puisse servir à la précipitation du phosphore minéral et à sa séparation d'avec le phosphore organique et nous avons décidé d'employer la méthode SCHMITZ dans toutes nos expériences ultérieures.

CHAPITRE V

DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PAR LA METHODE COPAUX

Cette méthode, comme nous l'avons vu, nous ayant donné d'excellents résultats rapides et suffisamment précis, dans le dosage des glycéro-phosphates, il nous a paru intéressant de tenter son application au dosage du phosphore organique urinaire.

Nous avons employé, pour la séparation des phosphates minéraux, la technique de Schmitz, scrupuleusement, selon les indications de l'auteur, mais en opérant, naturellement, sur un volume d'urine suffisant, proportionné à la sensibilité de la méthode.

Sur 200 cm³ d'urine additionnés de 8 gr. de chlorure d'ammonium et 4 cm³ de solution saturée de nitrate de magnésie, portés à l'ébullition, précipités par l'ammoniaque, refroidis, additionnés de nouveau de 10 cm³ d'ammoniaque et complétés dans une fiole jaugée à 250 cm³, nous avons prélevé 200 cm³ du filtrat contenant 160 cm³ d'urine. Nous les avons soumis à la destruction nitrico-magnésienne, dans un ballon Kjeldahl, sur un bain métallique à 300° environ, avec 20 cm³ d'acide azotique, ajoutés en deux fois, et 10 cm³ de solution saturée d'azotate de magnésie.

Le résidu obtenu, tout à fait blanc, dissous dans le minimum d'acide chlorhydrique et d'eau a été reprécipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.

Cette opération a pour effet d'obtenir une composition plus homogène et plus pure, car le complexe phosphomolybdique, dans la méthode COPAUX, a l'inconvénient de présenter, à sa surface, une couche d'impuretés plus ou moins épaisse, repré-

sentant 2 à 3/10 de mg. de $P^2 O^5$ qui rend la lecture de l'ampoule difficile, donc les chiffres incertains.

Le phosphate ammoniaco-magnésien a été recueilli sur un petit filtre, bien lavé à l'eau ammoniacale, et dissous sur le filtre même avec 2 cm³ d'acide azotique et quelques cm³ d'eau, avant d'être versé dans l'ampoule (Voir première partie).

Nous avons obtenu : 2 mg. 5 sur 160 cm³, soit 15 mg. 6 sur 1.000 cm³.

100 cm³ de la même urine, traités dans les conditions précédentes, complétés après la précipitation des phosphates minéraux à 125 cm³, nous ont donné, sur 100 cm³ du filtrat : 1 mg 25 de $P^2 O^5$, donc des chiffres concordants, et 50 cm³ 0 mg. 8 de $P^2 O^5$.

Conclusion

Cette méthode, quoique d'un maniement facile et d'une assez grande rapidité, susceptible de donner des résultats suffisamment exacts dans le dosage de glycérphosphate est difficilement applicable au dosage de phosphate organique urinaire, à cause de deux raisons :

1° Malgré la reprécipitation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, on ne peut pas éviter complètement l'entraînement des impuretés si l'on opère sur une quantité de 100 ou 200 cm³ et les résultats sont incertains.

2° Au contraire, si l'on se décide à opérer sur une petite quantité, le phosphore organique se trouve en si faible quantité qu'il est difficilement dosable.

Cependant nous avons constaté que cette méthode donnait comparativement, les mêmes résultats que la méthode colorimétrique, et nous la considérons comme un contrôle de cette dernière. Nous avons obtenu, dans un cas, par exemple, 22 mgs 3 par la colorimétrie et 19,7 $P^2 O^5$ par la méthode Copaux.

CHAPITRE VI

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE ADOPTÉE POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE URINAIRE

Elle comprend 3 phases :

1° Séparation d'abord des phosphates minéraux, à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, à chaud, au lieu de à froid.

2° Destruction du filtrat obtenu qui renferme le phosphore organique, par le mélange nitrico-magnésien, au lieu de la destruction sulfo-nitrique.

3° Dosage du phosphore organique par la colorimétrie, soit par la méthode BELL et DOISY, soit de préférence par la méthode coeruléo-molybdique de DENIGÈS.

Voici la technique :

Première phase : SÉPARATION. — 100 cm³ d'urine acide, ou si elle présente la réaction alcaline, rendue préalablement acide par quelques gouttes d'acide chlorhydrique, sont additionnés de 4 grammes de chlorhydrate d'ammoniaque et de 2 cm³ d'une solution saturée de nitrate de magnésie, puis mis dans un vase à précipitation chaude, d'une capacité de 150 à 200 cm³ et chauffés doucement sur une toile métallique au-dessus d'une petite flamme, à une lente ébullition. On fait couler goutte à goutte, d'une burette fixée au-dessus, en agitant doucement avec une baguette de verre, sans toucher les parois du récipient, la quantité d'ammoniaque nécessaire (préparée en mélangeant 2 cm³ 1/2 de solution officinale d'ammoniaque et 97 cm³ 1/2 d'eau) à la précipitation complète des phosphates, jusqu'à ce qu'on en sente l'odeur (technique SCHMITZ). On retire le vase du feu, on le laisse refroidir, on y ajoute encore 5 cm³ d'ammoniaque et, 10 minutes après, on complète le volume à 125 cm³, avec de l'eau.

On lave le précipité avec 25 cm³ d'eau ammoniacale à 1 0/0, de façon à faire passer dans le filtrat les traces de phosphore organique qui pourraient rester fixées au précipité.

On peut opérer également sur 50 ou 25 cm³ d'urine, en réduisant proportionnellement les réactifs.

Deuxième phase : MINÉRALISATION. — 5 cm³ du liquide filtrant ainsi obtenu, prélevés et mis dans un creuset en porcelaine de 45 millimètres de diamètre supérieur sur 40 de hauteur, sont additionnés de 2 cm³ d'acide azotique pur, exempt de phosphore, et de 10 gouttes d'une solution de nitrate de magnésie.

Le contenu est ensuite évaporé au bain-marie et le résidu sec est soumis à la destruction comme suit : On introduit le creuset, muni d'un couvercle, dans un autre plus grand, d'un diamètre de 55 millimètres sur 60 de hauteur, à l'intérieur duquel il est fixé sur un anneau d'amiante. Le tout est placé sur un triangle porté à la flamme d'un bec Bunsen, puis chauffé doucement pour commencer, en augmentant progressivement, jusqu'à ce qu'on s'aperçoive qu'il ne se dégage plus de vapeurs nitreuses.

Ce bain d'air a pour but d'éviter une surchauffe, le contact brutal et direct de la flamme avec le creuset pouvant provoquer l'attaque de la porcelaine. L'inconvénient qui survient dans ce cas est que la solution du résidu traitée ensuite par le réactif molybdique, donne une teinte bleu-verdâtre plus foncée que celle d'un beau bleu qu'on doit obtenir habituellement (*).

Le résidu obtenu par la calcination reste blanc et facilement soluble dans quelques cm³ d'eau acidulée par 12 gouttes d'acide sulfurique.

(*) Cet inconvénient a été constaté également par KLEINMANN, qui, à la suite d'une expérience faite à blanc dans une capsule de porcelaine avec des réactifs sans phosphore, obtient, par l'addition de réactif strychno-molybdique, une liqueur fortement troublée; tandis que la même expérience faite dans un creuset de platine ne présente plus cette particularité.

Il faut éviter aussi d'opérer dans les tubes de verre, qui ne résistent pas toujours à la température au rouge, ainsi que dans le verre Pyrex, dont plusieurs échantillons nous ont donné une coloration bleue en opérant à blanc.

La porcelaine, au contraire, avec les précautions que nous avons prises, nous a donné toute satisfaction, ce qui nous a déterminé à nous en servir exclusivement dans toutes nos opérations.

On recueille soigneusement dans le creuset toutes les petites parties du précipité projetées sur le couvercle, au moyen de 4 gouttes d'acide sulfurique et trois lavages successifs avec quelques gouttes d'eau ; on ajoute encore 8 gouttes d'acide et 2-3 cm³ d'eau, en agitant doucement avec une baguette de verre pour faciliter la dissolution du résidu.

Il faut cependant employer le minimum d'eau dans cette opération, afin d'obtenir un volume aussi réduit que possible. Le liquide ainsi obtenu est versé dans un tube ou éprouvette gradué, de 25 à 30 cm³.

Troisième phase : A). COLORIMÉTRIE par la méthode BELL et DOISY. — Le liquide étant prêt à être dosé, on prépare l'étalon colorimétrique.

Ici, nous faisons remarquer que pour obtenir le maximum de précision, il est bon de constituer au moins deux types, l'un contenant 0 mg.05 et l'autre 0 mg.1 de P² O⁵ minéral. Le contenu en P² O⁵ de la solution à examiner sera généralement compris entre ces deux types. Si la solution contient plus de 0 mg. 05, on effectuera la comparaison avec ce type, si elle contient moins on se servira de l'autre.

La réaction colorimétrique exige un milieu légèrement acide et son intensité est toujours en fonction de la quantité d'acide minéral introduit.

Donc, étant donné que le résidu est légèrement alcalin et qu'il exige pour sa neutralisation 6 gouttes d'acide sulfurique, nous avons convenu, afin d'établir une acidité comparable dans les deux solutions, d'ajouter 6 gouttes d'acide aux solutions types et 12 gouttes à la solution à examiner.

On ajoute ensuite dans chacun des trois tubes 1 cm³ de réactif molybdique (*) et 2 cm³ de solution d'hydroquinone, puis;

(*) La préparation des réactifs se fait ainsi :

1^o Réactif molybdique : 50 gr. de molybdate d'ammoniaque sont dissous dans un litre d'acide sulfurique normal, 5 cm³ de ce réactif additionnés de 5 cm³ d'hydroquinone et traités après 5 minutes de 25 cm³ de solution-carbonate sulfite doivent donner une solution complètement incolore.

2^o Solution d'hydroquinone : elle est préparée avec 20 gr. d'hydroquinone pur dissous dans un litre d'eau et additionnés d'un cm³ d'acide sulfurique.

3^o Solution carbonate-sulfite : 2.000 cm³ d'une solution à 20 o/o de carbonate de soude sont mélangés avec une solution de 75 gr. de sulfite de soude dissous dans 500 cm³ d'eau.

après 5 minutes de contact, 10 cm³ de solution de carbonate-sulfite, et on porte le volume à 25 cm³ avec de l'eau.

Ensuite, on pratique la lecture colorimétrique sous une hauteur de 30 mm.

La réduction doit se faire presque en même temps dans les trois tubes, après l'addition des réactifs, lentement et progressivement et prendre la teinte bleue pour atteindre, au bout de 5 minutes, son maximum.

Il arrive cependant, parfois, qu'au bout de 5 minutes, ce maximum n'est pas atteint et que plusieurs lectures successives au colorimètre indiquent des chiffres de plus en plus bas. On est obligé alors d'attendre encore quelques minutes et parfois davantage, pour enregistrer des chiffres constants.

Au contraire, si la solution reste insensible aux réactifs ajoutés et garde la teinte légèrement jaunâtre due à l'hydroquinone, c'est que la matière organique n'a pas été complètement détruite et que sa présence empêche totalement ou partiellement la réaction. L'urine était trop chargée de substances à détruire et la quantité d'acide par conséquent insuffisante.

On doit recommencer la destruction en employant 3 ou 4 centimètres cubes d'acide azotique au lieu de 2 cm³, l'opération se fera alors dans de bonnes conditions et le dosage s'effectuera immédiatement.

Il arrive encore qu'à la suite d'un chauffage trop intense, la porcelaine soit plus ou moins attaquée.

Dans ce cas, au moment de l'addition des réactifs molybdique et d'hydroquinone, la réaction se fait brusquement avec formation d'une teinte verdâtre très marquée qui imprime à la solution, même après l'addition de carbonate-sulfite, une teinte d'un bleu foncé plutôt verdâtre.

Cette différence de teinte, qui peut ne pas être visible à l'œil, est facilement reconnue d'un seul coup au colorimètre, car la teinte du type est franchement bleue, tandis que l'autre présente une nuance de bleu plutôt verdâtre.

B) COLORIMÉTRIE *par la méthode cœruléo-molybdique Denigès.*

Nous rapportons ici la description entière de la technique DENIGÈS et la préparation de ses réactifs.

1) *Réactif sulfo-molybdique.* — Il se prépare en mélangeant

parties égales de solution de molybdate d'ammoniaque à 10 0/0 et d'acide sulfurique pur à 66°.

2) *Réactif stanneux*. — On dissout au bain-marie bouillant, en agitant, 0 gr. 10 d'étain en feuilles dans 2 cm³ d'acide chlorhydrique pur et concentré et on complète à 10 cm³ au moyen d'eau distillée. Ce réactif doit être renouvelé tous les 4 ou 5 jours.

La technique est alors celle-ci :

Comme le volume final auquel la solution destinée à la mesure colorimétrique doit être amenée est seulement de 10 cm³ dans ce cas, au lieu de 25, dans le cas précédent, et que, de plus, la méthode de Denigès est plus sensible que celle de Bell et Doisy, on peut prélever, pour la destruction, un volume plus petit (1 ou 2 cm³ du filtrat au lieu de 5).

1 cm³ du filtrat obtenu après la séparation des phosphates minéraux à chaud, exposée précédemment, est introduit dans un petit creuset en porcelaine de 35 mm. sur 30 mm., additionné de 8 gouttes d'acide azotique et 3 gouttes de solution saturée d'azotate de magnésie, et ensuite soumis à la calcination suivant les règles décrites. Le résidu obtenu après la calcination est dissous dans quelques cm³ d'eau distillée, acidulée par 3 gouttes d'acide sulfurique.

Si la quantité de phosphore organique qui se trouve dans l'urine est très faible on prélève 2 cm³ du filtrat au lieu d'un, et on augmente de même proportionnellement les réactifs.

La solution est ensuite versée dans un tube gradué en cm³ et neutralisée en présence d'une goutte de phénolphtaléine avec de la soude pure et diluée, on note le nombre de cm³ de soude employés.

La solution type est alors préparée comme suit :

Dans un autre tube gradué semblable au premier, on verse la solution phosphorique, renfermant 0 mg. 01 à 0 mg. 02 de P² O⁵ minéral, selon la quantité du phosphore, que l'on présume exister dans la solution à examiner et une quantité de soude égale à celle utilisée précédemment, puis l'on neutralise, au moyen d'acide sulfurique, en présence d'une goutte de phénolphtaléine.

Finalement on complète les deux tubes à 10 cm³ avec de

l'eau et on ajoute successivement les réactifs, 0 cm³ 4 de réactif molybdique et 0 cm³ 1 de réactif stanneux.

Après deux minutes, la teinte bleue obtenue a atteint son maximum, l'on dose au colorimètre.

§ I. — MÉLANGE DU PHOSPHORE MINÉRAL ET DE GLYCÉROPHOSPHATE DE SOUDE. APPLICATION DE LA MÉTHODE AU FILTRAT OBTENU APRÈS LEUR SÉPARATION (*Influence des sels contenus dans le filtrat sur la colorimétrie*).

Tout d'abord nous avons effectué, à blanc, l'opération suivante, afin de déterminer l'influence que pourrait avoir le filtrat obtenu après la précipitation à chaud du phosphore à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien sur la colorimétrie.

100 cm³ de solution phosphorique (2 gr. P² O⁵ par 1.000 cm³) précipités à chaud, avec 4 gr. de chlorure d'ammonium, 2 cm³ de solution saturée d'azotate de magnésie, et Q. S. d'ammoniaque sont complétés, dans une fiole jaugée à 125 cm³, avec de l'eau, additionnés de 4 mgs P² O⁵ du glycérophosphate et puis filtrés. Sur 5 cm³ du filtrat, après la destruction nitrico-magnésienne et le dosage au colorimètre, nous avons trouvé : 3 mg. 72 P² O⁵, soit une erreur de 7 0/0.

Donc la destruction, de même que le dosage colorimétrique n'étant pas influencés d'une façon très sensible par la présence de sel de magnésie et d'ammoniaque existants dans le filtrat, nous l'avons appliquée à une série de mélanges de solution de phosphate minéral contenant successivement 4, 6, 8 et 10 mg P² O⁵ de glycérophosphate.

Les résultats obtenus au colorimètre après la destruction des 5 cm³ de filtrat sont consignés dans ce tableau :

Expérience N ^o	Quantité de P ² O ⁵ sous forme glycéro en mgs.	Quantité de P ² O ⁵ trouvé dans le filtrat après la destruction nitrico-magnésienne	Perte %
1	4	3,82	— 4,5
		3,92	— 2
2	6	5,57	— 7,1
3	8	7,51	— 6,1
4	10	9,87	— 1,3

donc avec une perte moyenne de — 4,2 0/0

§ II. — APPLICATION COMPARATIVE DES DEUX MÉTHODES SUR DES URINES NORMALES.

Avant d'exposer nos résultats, nous reproduisons ici les détails de leur technique.

25 cm³ d'urine, mis dans un flacon Erlenmeyer, sont traités par 7 cm³ de mixture magnésienne (*) et laissés en repos de 6 à 18 heures. 5 cm³ du filtrat ainsi obtenu sont soumis à la destruction sulfo-nitrique et traités dans un tube Pyrex de 25 cm³ par 12 gouttes d'acide sulfurique, 2 gouttes de solution de sulfate de cuivre à 10 0/0 et deux ou trois morceaux de silice.

Le tube est ensuite chauffé soigneusement au-dessus d'un micro-brûleur jusqu'à ce que le liquide soit réduit à 2 cm³ environ. On ajoute après 1 cm³ d'acide azotique pur et on chauffe jusqu'à ce que le liquide devienne clair, coloré seulement par le cuivre. Au cas contraire, on renouvelle l'addition de l'acide azotique et on continue le chauffage.

Après la décoloration complète du liquide, on laisse refroidir et on ajoute 5 cm³ d'eau, on chauffe de nouveau jusqu'à l'ébullition et, après le refroidissement, on neutralise à une teinte bleue profonde, avec de l'ammoniaque dilué au demi et redistillé.

La solution étant prête pour le dosage colorimétrique, après l'addition de 5 à 6 gouttes d'acide sulfurique, 1 cm³ réactif molybdique, 2 cm³ d'hydroquinone et 10 cm³ carbonate-sulfite, on complète à 25 cm³, on la compare avec un échantillon type préparé de même façon.

Sur trois urines normales, nous avons fait des dosages comparatifs par les deux méthodes et rapportant les chiffres à 1.000 cm³, nous ont donné les résultats ci-dessous :

URINE N° 1.

a) *Destruction nitrico-magnésienne :*

100 cm³ d'urine, 4 gr. de chlorhydrate d'ammoniaque, 2 cm³ de solution saturée d'azotate de magnésie, après précipitation,

(*) La mixture magnésienne est préparée avec 55 gr. de chlorure de magnésie pur et 70 gr. de chlorure d'ammonium, 300 cm³ d'ammoniaque dilués et portée à un litre avec de l'eau distillée.

sont complétés à 125 cm³. Sur 5 cm³ de filtrat, après la destruction et traitement par les réactifs, nous avons obtenu par la colorimétrie : 12 mg. 07 P² O⁵ 0/00.

b) *Destruction sulfo-nitrique* :

Sur 5 cm³ du filtrat de la même urine, après la destruction : 2 mg. 07 P² O⁵ 0/00.

URINE N° 2.

a) *Destruction nitrico-magnésienne*. — Trouvé 2 mgs 50 P² O⁵ pour 1.000.

b) *Destruction sulfo-nitrique*. — Après cette destruction, la lecture au colorimètre n'est pas possible à cause de la teinte presque inexistante de la liqueur.

URINE N° 3.

Cette urine nous a donné une différence de 28 0/0 entre les deux méthodes. Nous avons obtenu, par nitrico-magnésienne : 15 mgs 68 P² O⁵ 0/00 ; par sulfo-nitrique : 11 mgs 29 P² O⁵ 0/00.

Conclusion :

Dans ces expériences, nous constatons que les chiffres obtenus par la destruction sulfo-nitrique sont toujours inférieurs à ceux obtenus par la destruction nitrico-magnésienne.

La perte est parfois plus importante que celle de 11,5 — 15 p. 100, que YOUNBURG et PUCHER reconnaissent n'avoir pu éviter dans leurs opérations. Cette perte paraît être en fonction de la richesse en matière organique de l'urine sur laquelle on opère.

(*) Le résultat si discordant est peut-être dû à une suite de circonstances défavorable accumulant les pertes (perte à la séparation magnésienne et perte à la destruction).

CHAPITRE VI

APPLICATION DE LA METHODE

Nous avons appliqué cette méthode :

- 1° Aux urines normales.
- 2° Aux urines pathologiques.
- 3° A quelques recherches sur la nature du phosphore organique urinaire.

A. — VARIATIONS CHEZ LES NORMAUX.

Nous présentons ici un aperçu des dosages effectués sur des urines recueillies dans diverses conditions.

	Urine N°	P2 O5 en mgs trouvé par litre
Emission totale de 24 heures de plusieurs individus	1	8,42
	2	13,8
	3	9,2
	4	11,7
	5	16,9
Emission de la journée d'un seul individu	11 h. matin 6	2,5
	3 h. après-midi 7	3,8
	6 h. soir 8	4,3
Emission totale de la nuit de trois autres sujets :	9	19,8
	10	22,5
	11	12,8

Nous avons cru intéressant de comparer nos résultats avec ceux publiés par d'autres auteurs :

Nom de l'auteur	Nature de la recherche	P ₂ O ₅ en mg. trouvé par litre	Méthode employée
LÉPINE ET EYMONNET (11)	urines normales. phthisique, affecté de « foie gras »	10 à 15 mgs. par litre. 5 à 6 fois plus élevés	Précipitation ammoniacomagnésienne. Destruction par nitrate de potassium
ZUELZER (12)	urines normales adultes.	42 à 60 mgs. par 24 h.	Phosphate ammoniacomagnésien, titré à l'urane ou par l'alcalinimétrie.
HORST OERTEL (15)	« «	30 à 120 mgs. par 24 h.	Phosphomolybdate, phosphate ammoniacomagnésien.
CHAPELLE (15)		60 à 80 mgs. par 24 h.	—
KELLER (16)	enfants normaux	2 mgs 18 à 16,7 par 24 h.	Phosphate ammoniacomagnésien pyrophosphate.
G. E. YOUNGBURG ET W. G. PUCHER (19)	urines normales adultes.	par kg. : 0 mg. 089 à 0 mg. 187 avec une moy. de 0 mg. 138 par kg., généralement chiffres inférieurs à 10 mgs par litre.	Colorimétrie.
FEIGL JOHN (46)	urines pathologiques	jusqu'à 600 mgs. par 24 h.	alcalinimétrie et phosphomolybdate, principe Neumann.

Ces tableaux comparatifs nous montrent que les chiffres sont, pour la plupart, bien supérieurs aux nôtres. Nous pouvons admettre que l'explication se trouve plus ou moins dans l'insuffisance des moyens mis en œuvre, ou dans l'imperfection des méthodes.

Par contre YOUNBURG et PUCHER *obtiennent* des résultats inférieurs, nous avons vu précédemment que, dans la destruction sulfo-nitrique, le phosphore peut se volatiliser et nous trouvons là, sans doute, l'une des raisons du déficit.

Ils constatent, d'autre part, la disparition partielle, au bout d'un certain temps, du phosphore organique, dans les urines laissées au repos.

Nous avons contrôlé cette affirmation sur une seule urine qui ne nous permet pas de la confirmer.

Nous avons examiné, à différents intervalles de 9, 18, 27 et 58 jours, une urine de 24 heures, conservée au toluène et avons dosé le

1 ^{er} jour :	10 mg. 8
9 ^e jour :	10 mg. 5
18 ^e jour :	10 mg. 3
27 ^e jour :	10 mg. 7
58 ^e jour :	8 mg. 2

Mais nous avons constaté comme eux que les urines émises pendant la nuit sont plus riches en phosphore organique que le jour.

B. — VARIATION CHEZ LES MALADES.

Les travaux les plus intéressants de recherche et dosage du phosphore organique dans les urines, sont ceux consacrés aux différents cas pathologiques.

Nous nous sommes procuré un certain nombre d'urines dans lesquelles, d'après les auteurs antérieurs, la quantité de phosphore organique éliminé serait supérieure à la normale.

Ces urines appartiennent à trois catégories de malades : nerveux, tuberculeux et cancéreux.

NATURE DE LA MALADIE		P ² O ⁵ en mg.	
MALADIES NERVEUSES		trouvé	
		par litre	en 24 h
59 ans. <i>Paralysie générale</i> . En rémission avec une syphilis en évolution datant de 20 ans. R.W. +		21,6	16,8
34 ans. <i>Paralysie générale</i> , due à la syphilis en rémission relative. R.W. +		17,3	7,4
38 ans. <i>Paralysie générale</i> , état stationnaire		19,7	11,8
64 ans. Probablement <i>mélancolie</i> avec ramollissements cérébraux. R.W. +		12,8	4,5
65 ans. <i>Mélancolie</i> , trois attaques, aphasique avec ramollissements cérébraux. R.W. —		22,5	7,1
56 ans. <i>Phase mélancolique d'une folie périodique</i> . R.W. —		11,9	8,3
39 ans. Maniaque au début, <i>accès mélancolique</i> , en voie de démence, avec intelligence diminuée....		17,4	12,8
26 ans. <i>Psychose-traumatique</i> due à une chute de cheval		22,4	12,3
22 ans. <i>Démence</i> précoce en période d'agitation, avec attaque épileptique		12,1	15,3
R.W. = Réaction de Wassermann.			

TUBERCULOSE PULMONAIRE

20 ans. Etat général médiocre. Température 38°8 —39°. Bacilles de Koch extrêmement nombreux.	58,2	26,5
36 ans. Situation générale médiocre. Toux, crachats, température 38°2—39°2, quelques bacilles Koch.	46,5	38,4
20 ans. Etat général médiocre, température 38°8. Nombreux bacilles de Koch	31,0	32,5

CANCER

Trois urines de cancéreux nous ont donné, par 24 heures :
13 milligr. 6 — 15 milligr. — 18 milligr. 2.

Sauf chez les tuberculeux nous n'avons donc pas trouvé une différence très sensible dans l'élimination de phosphore organique de ces différents malades avec celle éliminée par les normaux.

ROBIN (41) et SYMERS (45) avaient admis que, dans la neurasthénie et les maladies de dégénérescence du système nerveux, les individus élimineraient jusqu'à 30 0/0 du phosphore total urinaire, cependant trois urines de neurasthéniques nous ont donné également les résultats négatifs, car nous avons obtenu 16 mg. 42, 21 mg. 5, 12 mg. 8 de P² O⁵ par litre.

Par contre, chez les tuberculeux présentant une mauvaise situation générale, porteurs de bacilles de Koch, avec une température très élevée, nous avons enregistré une augmentation sensible de phosphore organique, dans les quelques urines que nous avons examinées. Nous regrettons de n'avoir pu nous procurer d'urines de fiévreux pour nous permettre de vérifier si cette augmentation était due à la température ou à la présence de bacilles de Koch.

QUELQUES ESSAIS SUR LA NATURE DU PHOSPHORE ORGANIQUE URINAIRE

Nous avons déjà vu que les glycérophosphates sont des corps qui offrent à l'action hydrolysante des acides et alcalis les plus forts, une résistance très marquée, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail.

Or, depuis les travaux déjà anciens de SOTNICHEWSKY, on tend à admettre que le phosphore organique urinaire serait constitué en totalité ou en partie d'acide glycérophosphorique (CHAPELLE, DENIGÈS).

En admettant cette hypothèse, le phosphore organique urinaire devrait se comporter comme l'acide glycérophosphorique, sous l'action des acides.

Voici les expériences que nous avons faites sur une même urine, qui concernent la nature du phosphore organique urinaire.

1° Dosage du phosphore organique urinaire.

2° Dosage après hydrolyse de 2 heures à l'acide chlorhydrique.

URINE N° 1

Expérience 1 : Sans hydrolyse.

100 cm³ d'urine additionnés de 4 gr. de chlorure d'ammonium et 2 cm³ solution saturée de nitrate de magnésie, sont précipités à chaud, complétés à 125 cm³, le liquide est filtré, et, sur 5 cm³ du filtrat, après la destruction, on obtient : 15 mg. 75 P² O⁵ 0/00.

Expérience 2 : Urine hydrolysée.

100 cm³ sont soumis à l'ébullition dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, en présence de 10 cm³ d'acide chlorhy-

drique concentré. Après l'hydrolyse, l'acide est neutralisé par l'ammoniaque et précipité à chaud. Trouvé : 16 mg. 2 P² O⁵ 0/00.

Expérience 3 : Opération semblable, l'urine a été, de plus, additionnée de 4 mg. P² O⁵ sous forme de glycérophosphate de soude : Total trouvé : 20 mg. 09 P² O⁵ 0/00 (16,25 phosphore organique urinaire ; 3,84 phosphore organique glycérophosphate), soit une perte de 4 0/0 sur la quantité du P² O⁵ ajoutée.

URINE N° 2

- 1) Urine sans hydrolyse. Trouvé : 18 mg. 1 P² O⁵ 0/00.
- 2) Urine hydrolysée telle quelle. Trouvé : 17 mg. 35 P² O⁵ 0/00.
- 3) Urine hydrolysée avec 4 mgs P² O⁵ sous forme de glycérophosphate de soude. Trouvé : 21 mg. 75 P² O⁵ 0/00, soit une perte de 9 0/0 sur la quantité de glycérophosphate ajoutée.

URINE N° 3

- 1) Urine sans hydrolyse et sans glycérophosphate. Trouvé : 5 mg. 65.
- 2) Urine hydrolysée telle quelle. Trouvé : 5 mg. 85.
- 3) Urine hydrolysée avec 4 mgs P² O⁵ de glycérophosphate de soude. Trouvé : 9 mg. 53, soit une perte de 3,5 0/0.

Conclusion

Ces trois expériences montrent que le phosphore organique urinaire se comporte de la même façon que les glycérophosphates, sous l'action hydralysante des acides minéraux.

A la suite d'une hydrolyse de 2 heures à 10 0/0 d'acide chlorhydrique pur, nous ne pouvons pas conclure à un dédoublement du phosphore organique urinaire, la différence étant comprise dans les limites des erreurs d'expérience.

Ces résultats peuvent être considérés comme favorables à l'hypothèse selon laquelle le phosphore organique urinaire serait constitué en tout ou en partie, par de l'acide glycérophosphorique.

CONCLUSION

Dans ce travail consacré à l'étude de deux méthodes de dosage du phosphore et de leurs applications, nous avons établi les points suivants :

A. — *Dans la première partie :*

1° Une étude préalable de la méthode de COPAUX, nous a montré l'importance considérable des proportions relatives d'acide et de réactif molybdique pour amener la précipitation complète du complexe phosphomolybdique.

2° La méthode de COPAUX s'applique facilement au dosage du phosphore dans les glycérophosphates de soude et de chaux après minéralisation convenable obtenue facilement par l'emploi de la destruction nitrico-magnésienne de FONTES et THIVOLLE légèrement modifiée.

3° Notre méthode, appliquée au saccharure granulé, nous a montré l'influence perturbatrice des produits de destruction du saccharose, influence facile à annihiler et qui paraît due en partie tout au moins à la formation d'acide oxalique.

4° Nous avons utilisé notre méthode pour faire quelques essais d'hydrolyse comparée entre les glycérophosphates α et β par les acides, les alcalis et la glycérophosphatase des graines. Nous avons ainsi confirmé la résistance remarquable de ces corps à l'hydrolyse acide et surtout alcaline ainsi que leur comportement identique dans l'hydrolyse acide malgré leur structure différente et nous avons montré que les deux glycérophosphates se comportaient de même dans l'hydrolyse par la glycérophosphatase.

5° Nous avons montré que, grâce à cette résistance remarquable, il était possible de rechercher et de doser rapidement par la méthode de COPAUX, le phosphore minéral contenu dans un glycérophosphate, en tenant compte cependant que l'acide

glycérophosphorique amène dans le dosage une perturbation d'ailleurs facile à éviter.

B. — *Dans la deuxième partie.*

1° Après un historique des nombreux travaux déjà consacrés au phosphore urinaire, nous avons étudié successivement les trois phases que comporte nécessairement ce dosage : séparation du phosphore organique d'avec le phosphore minéral, minéralisation du phosphore organique, enfin son dosage, en examinant les diverses solutions qui ont été proposées pour chacun de ces problèmes.

2° Nous donnons une technique essentiellement caractérisée :

I. — pour une séparation du phosphore organique d'avec le phosphore minéral sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien précipité à *chaud*. — II. — Par une minéralisation à l'aide d'une destruction nitrico-magnésienne. — III. — Par un dosage colorimétrique au moyen de la réaction coeruleo-molybdique.

3° Nous l'avons appliqué à la détermination du phosphore organique d'un certain nombre d'urines normales et pathologiques. Le taux d'élimination par litre paraît être de 10 à 20 mgs.

Sur les trois catégories de malades observés (neurasthéniques, concréreux et tuberculeux avancés, nous n'avons observé de variations notables que chez les tuberculeux où le taux atteint 40 à 60 mgs.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

GRIMBERT.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. LAPIE.

BIBLIOGRAPHIE

- (1). COPAUX. — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. (Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences, 1, 173, 1921-22, page 656.)
- (2). DARIC. — Observations et expériences nouvelles sur le dosage rapide de l'acide phosphorique par la méthode de H. Copaux. (*Bull. Soc. Chimie Biologique*, mars 1924, 45, p. 409.)
p. 5.)
- (3). FRANÇOIS. — Vérification des méthodes d'essai de glycérophosphates et du granulé. (*Journal de Pharmacie et de Chimie*, 910, I, 10,
- (4). NÉMÉC. — Zur Kenntnis der Glycerophosphatase der Pflanzensamen. (*Biochemische Zeitschrift*, 137, 1923, p. 570.)
- (5). FALK ET SIGUIRA. — Studies on enzyme action the esterase and Lipase Castor Beans. (*Journal of the American Chemical Society*, 37, I, 1925.)
- (6). YVON ET MICHEL. — Analyse des urines, 8^e édit., p. 224.
- (7). RONALDS. — *Philosophical transactions*, 846, p. 463, d'après *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, t. 29, 1900, p. 147.
- (8). HOPPE SEYLER. — *Handb. d. Phys. u. Pathol. Chem. Analyse*. (Berlin, 1875, p. 119), d'après *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, t. 4, 1880, p. 214.
- (9). KLUPFFEL ET FEHLING. — *Zeitschrift für Physiol. Chemie*, I, IV, 214, 1881.
- (10). SOTNITSCHESKY. — Glycerniphosphorsaure in Menschlichen Harn. (*Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1880, I, 4, p. 244.)
- (11). LÉPINE ET EYMONNET. — *Compte rendu Soc. Biol.* 1882, I, 4, p. 622.
- (12). ZUELZER. — *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1898-99, 1, 16.
- (13). MARCUS. — *Pflügers Archive*, 1897, I, 67, p. 363.
- (14). PASCALIS. — *Anali di Chimica et di Pharmacologia*, 20 Agosto, 1894, d'après *Biochemische Zeitsch.*, 1910, p. 200.
- (15). HORST OERTEL. — Beitrag zur Kenntnis des Ausscheidung des Organisch Gebunden Phosphors. (*Zeitschrift für Physiologische Chemie*, I, 29, 1900, p. 147.)
- (16). KELLER. — Organische Phosphor Verbindungen im Sauglingsharn ihr Ursprung und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel. (*Zeitschrift für Physiol. Chem.*, t. 29, 1900, p. 147.)

- (17). KLERK ET KOOK. — *Journal of Biological Chemistry*, 2, 203, 1906.
- (18). YOSHIMOTO. — *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 64, 464, 1910.
- (19). G. E. YOUNGBURG ET PUCHER. — *Analytical Methods and Observations on the organic Phosphorus of the urine*, p. 29-62, 1924-25.
- (20). STOLBA. — *Zentralblatt*, 1876, p. 727.
- (21). BAUZIL. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1917, p. 321.
- (22). BALAREWS. — *Zeitsch. f. anorg. chem.*, 104, 53-56, 13/8 1918.
- (23). LORENZ. — *Zeitsch. f. anal. Chem.*, 1907.
- (24). NEUBAUER. — *Zeitsch. f. angew. Chemie*, 1896, 439.
- (25). HUNDESCHAGEN. — *Zeitsch. f. anal. Chem.*, 28, 1889.
- (26). NEUMANN. — Einfache Veraschungs methode (saure-gemisch. Veraschung und vereinfachte Bestimmungen von Eisen-Phosphorsäure), salzaue und anderen Aschen bestandtheilen unter Benutzung diser sauregemisch-veraschung. (*Zeitsch. f. Physiol. Chem.*, t. 37, 1902, p. 115.)
- (27). PREGL. — *Microanalyse organique quantitative*, 1923.
- (28). J. P. GREGERSEN. — Über die alcalinimétische Phosphorsäure Bestimmung nach Neumann. (*Zeitsch. f. Physiol. Chemie*, 53, 453, 1907.)
- (29). HEUBNER. — *Biochemische Zeitschrift*, 64, 393, 1914.
- (30). TAYLOR ET MILLER. — *Journal of Biological Chem.* 18, 215, 1914.
- (31). KLEINMANN. — Über die Bestimmung der Phosphorsäure. (*Biochemische Zeitschrift*, 99, 1919, p. 19.)
- (32). KUHN. — Zur Microbestimmung der Phosphorsäure. (*Zeitsch. für Physiol. Chem.*, 1923, 29.)
- (33). LEULIER. — *Bulletin Pharmaceutique de l'Est*, n° 17, p. 10.
- (34). JOLLES. — *Chem. Zeitschrift*, 1889, 807.
- (35). SATO. — *Biol. Chem.*, 35, 473-74, 1918.
- (36). G. MISSON. — *Chem. Zeitung*, 32, 633, 1918.
- (37). DENIGES. — Détermination quantitatives des plus faibles quantités de phosphore dans les produits biologiques par la méthode cœruleo-molybdique. (C. R. de la Soc. de Biologie, mai 1921, p. 875.)
- (38). GRIGAUT. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, I, 1, n° 3, 1925.
- (39). RIEGLER. — *Bull. Soc. Scientifique Acad. Romaine*, 2/272, 1915, d'après *Biochemische Zeitsch.*, 99, 1919, p. 10.
- (40). O. BAILLY. — *Recherches sur la constitution des éthers phosphoriques de la glycérine*, Thèse docteur ès sciences, Paris 1916, p. 120.
- (41). DENIGES. — *Précis de Chimie Analytique*, 1920.
- (42). VOZARIK. — *Zeitschrift f. Physiologische Chemie*, 1911-12, 76, p. 426.
- (43). FONTES ET THIVOLLE. — *Bull. Soc. Ch. Biolog.*, 1923, p. 783.
- (44). SCHMITZ. — *Zeitschrift für anal. Chemie*, 1906, 278.
- (45). SYMERS. — *Biochemische Zeitschrift*, 35, 617.
- (46). JOHN FEIGL. — Zur Frage des organisch. gebundenen Phosphors im menschlichen Harne. (*Bioch. Zeitsch.*, 89, 126, 34, 12/7, 22/3.

TABLE DES MATIERES

HISTORIQUE	7
------------------	---

PREMIERE PARTIE

LA METHODE DE COPAUX, SON APPLICATION A L'ETUDE DES GLYCEROPHOSPHATES

CHAPITRE I

ETUDE ET EXPOSE DE LA METHODE COPAUX

§ I. — Exposé	9
§ II. — Vérification de la méthode avec une solution de phosphate monopotassique pure	11
§ III. — Conditions d'application de la méthode de Copaux.....	12

CHAPITRE II

APPLICATIONS

§ I. — Application de la méthode à l'étude des glycérophosphates	17
§ II. — Dosage du phosphore dans les saccharures granulées de glycéro- phosphate de chaux	20
§ II. — Etude comparative de l'hydrolyse des glycérophosphates α et β par les acides, alcalis et les ferments	23

DEUXIEME PARTIE

INTRODUCTION	29
--------------------	----

CHAPITRE I

HISTORIQUE	33
------------------	----

CHAPITRE II

DOSAGE DU PHOSPHORE

§ I. — Dosage alcalinimétrique de l'acide phosphorique par l'alcalinimètre, du phosphate ammoniacomagnésien (méthode Bauzil).....	39
§ II. — Dosage à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque	43
§ III. — Alcalinimétrie du phosphomolybdate d'ammoniaque	45
§ IV. — Dosage du phosphore par la colorimétrie	51

CHAPITRE III

DESTRUCTION DE LA MATIERE ORGANIQUE

§ I. — Expérience pour le contrôle de la méthode de destruction nitrico-magnésienne	61
§ II. — Comparaison avec la destruction sulfo-nitrique selon la technique Younburg et Pucher	63

CHAPITRE IV

LES MOYENS USUELS DE SEPARATION ENTRE LE PHOSPHORE MINERAL ET LE PHOSPHORE ORGANIQUE

§ I. — Séparation à l'urane	65
§ II. — Séparation par le chlorure de calcium	66
§ III. — Séparation par l'eau de baryte	67
§ IV. — Séparation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien.....	67

CHAPITRE V

DOSAGE DU PHOSPHORE ORGANIQUE PAR LA METHODE COPAUX 71

CHAPITRE VI

DESCRIPTON DE LA TECHNIQUE ADOPTÉE POUR LE DOSAGE DU PHOSPHORE URINAIRE

§ I. — Mélange du phosphore minéral et de glycérophosphate de soude. (Influence des sels contenus dans le filtrat sur la colorimétrie)...	78
§ II. — Application comparative des deux méthodes sur des urines normales	79

CHAPITRE VII

APPLICATION DE LA METHODE

§ I. — Variations chez les normaux	81
§ II. — Variation chez les malades	83
§ III. — Quelques essais sur la nature du phosphore organique urinaire.	85
CONCLUSION	87

IMPRIMERIE DES PRESSES MODERNES

45, RUE DE MAUBEUGE, 45

PARIS

